



**Elektrické zvlákňování: koncept výroby nanovláken a
mikrovláken, možné aplikace vláknenných materiálů.**

HABILITAČNÍ PRÁCE

Soubor uveřejněných vědeckých prací nebo inženýrských prací doplněných komentářem

Anotace:

Habilitační práce je předložena ve formě komentovaného souboru prací dle Zákona č. 111/1998 Sb. Publikované výsledky přibližují význačný svět nanovláken a mikrovláken, zároveň také samotné technologie vedoucí k jejich přípravě. Habilitační práce je sepsána jako komentovaný soubor sebraných vědeckých prací. Jedná se o soubor impaktovaných článků, které jsou zaznamenány v databázích WoS nebo Scopus. Všechny publikované články jsou podpořeny uveřejněnými patenty, užitnými vzory, nebo přijatými patentovými přihláškami. Propojení všech těchto vědeckých a inženýrských prací může být důkazem, že aplikace nanovláknenných i mikrovláknenných materiálů směřují do průmyslové praxe. Dle zákona č. 111/1998 Sb je nutné uvádět také výstupy vědecko-pedagogické činnosti. Kvantifikace výsledků VaV bude uvedena v přehledné souhrnné tabulce v kapitole soubor vědeckých prací.

Habilitační práce je orientována na textilní technologie výroby vláknenných i nanovláknenných materiálů vhodných pro zdravotnické i technické aplikace. V práci jsou uveřejněny výsledky technického i biologického zaměření. Originalita práce spočívá zejména v propojení vědeckých publikací přímo s uveřejněnými patenty nebo užitnými vzory. V současné době je cíleno na možnou komercializaci vědeckých výstupů ve formě spolupráce s výrobním subjektem. V práci je uvedena přímá návaznost vědeckých článků a jejich propojení s průmyslovou sférou. Přínosem podaných výsledků je zejména novost vytvořených nanovláknenných materiálů a jejich následný aplikační potenciál. Příkladem může být nanovláknenný kožní kryt pro léčbu kožních poranění, který je ve fázi klinického testování. Pedagogická činnost zahrnuje výuku dvou předmětů, Zdravotnické textilie a předmětu Termické a chemické technologie.

Annotation:

The habilitation thesis is presented in the form of a commented work file according to Act No. 111/1998 Coll. The published results illustrate the prominent world of nanofibers and microfibers as well as the technology itself leading to their preparation. Habilitation thesis is written as a commented collection of collected scientific papers. These are impacted articles that are recorded in WoS or Scopus databases. All published articles are supported by published patents, utility models, or accepted patent applications. The continuity of all these scientific and engineering work may be evidence that the application of nanofibrous and microfibre materials leads to industrial practice. According to the law, it is also necessary to include scientific and pedagogical activities. Quantification of the R & D results will be presented in a synoptical summary table in the chapter of scientific work.

The habilitation thesis is oriented on the textile technology of production of fiber and nanofibrous materials suitable for medical and technical applications. In the work are published the results of the technical and biological focus. The originality of the work is mainly the linking of scientific publications directly with published patents or utility models. At present, there is a pressure on the possible commercialization of scientific outputs in the form of cooperation with the manufacturing entity. There is a direct link between the scientific articles and their links with the industrial sphere. The benefit of the results is the novelty of the created nanofibrous materials and their future application potential. An example can be a nanofibrous skin cover for the treatment of skin injuries that is in the clinical trial phase. Pedagogical activity is supported by the teaching of two subjects: Medical Textiles and Thermal and Chemical Technologies.

Obsah

Komentář k uveřejněným vědeckým pracím.....	10
Propojení vědeckých prací s inženýrskými poznatky.....	21
Vlastní přínos habilitační práce.	22
Závěr a poděkování:	24
Literární zdroje:	25
Souhrnná přehledná tabulka impaktovaných výsledků uvedených v habilitační práci	27
Seznam příloh:.....	28

Úvod do vědecké problematiky.

První kapitola této habilitační práce je rešerší v oblasti elektrostatického zvlákňování a nanovláken. Na publikace uvedené v rešerši, navazují svou habilitační prací, ve které je řešena technologická problematika v oblasti výroby vlákenných nanomateriálů.

Pokud se podíváme do historie nanovláken a nanovláknenných materiálů jako takových, dostaneme se do novověku. První zmínky, které je možné najít ve vědeckých publikacích a patentech ohledně elektrostatiky, se datují od 19. století, jejich autorem je Boys (1887). Ve svém článku píše o elektrospinningu jako o známé metodě, ale velice málo probádané. Autor se v tomto věnuje fyzikálnímu popisu procesu, o kterém tvrdí, že nemůže dosáhnout žádného praktického využití. Další záznam pochází od Mortona (1902) a patentový spis No. 705,691 nese název: Method of dispersing fluids. Zejména Zeleny (1914) provedl pokusy s měřením intenzity elektrostatického pole na vrcholu kapiláry. Prvotní experimenty s elektrostatickým rozprašováním by vedly k samotné výrobě nanovláken, pokud by byl použit vhodný polymerní roztok. V 60. letech 19. století publikuje následně firma Dupont patenty pro výrobu polymerních vláken z mnoha nových polymerů, což za dalších 40 let otevřelo nové možnosti ve zvlákňování, zejména v posunu do oblasti nanovláken.

V publikaci Deitzel et al. (2001) se uvádí možnost řízeně ukládat nanovlákná. Zařízení se sestává z jehly a kolektoru, ve kterém se mohou ukládat nanovlákná na přesně stanovená místa. Řešení ukázalo novou technologickou možnost, která byla následně využita v širokém měřítku. Stále se jedná o jehlové zvlákňování, které popisuje několik set, možná i tisíc publikací a patentů.

Velmi důležitý je patent Jirsáka a kol. (2005), díky němuž mohla být zahájena průmyslová výroba nanovláken. V současné době rozlišují dva základní typy zvlákňování, a to jehlové a bezjehlové. Jehlové probíhá za použití jednotlivých jehel a bezjehlové zvlákňování probíhá z volné hladiny. Bezjehlové zvlákňování umožňuje vyšší výrobnost a produktivitu, přičemž je možné vytvářet plošné nanovláknenné vrstvy. Výrobnosti současných strojů se pohybují v desítkách centimetrů až jednotek metrů za minutu a dosažené šíře činí 1,5 m i 2 m.

V následujících letech je možné nalézt nové konstrukční řešení elektrostatického zvlákňování za použití kolektoru. Využití fyzikálních zákonů, jakožto podpůrných metod ovlivnění elektrostatického pole v blízkosti kolektoru, popsal již Feynman (2001). V práci autorů Mitchell and Sanders (2006) jsou zmínky o možnosti vytvoření strukturně specifické plošné vrstvy nanovláken vlivem elektrostatických sil. V současné době se začíná objevovat nová možnost, jak vlákna vyrábět a zároveň ovlivňovat jejich strukturní parametry. Plošná hmotnost je jedním z hlavních materiálových parametrů, který spoluurčuje vlastnosti textilie. Možnosti ovlivňování plošné hmotnosti, a tím i 3D struktury, jsou popsány již o dva roky dříve autorem je Kessick et al. (2004). Porovnávání strukturních parametrů a mechanických vlastností nanovláknenných vrstev publikovali Kim G. H. (2006) a Kim C.H. (2006). V těchto publikacích byly srovnávány zejména klasické plošné nanovláknenné vrstvy se strukturovanými 2D-vrstvami a současně nanovláknennými vrstvami s vyšší plošnou hmotností. Výsledky buněčné migrace a proliferace jasně ukazují, že lepší výsledky poskytují strukturované vrstvy a vrstvy s vyšší plošnou hmotností. Současně se rozvíjí výroba 3D nanovláknenných materiálů.

Při využití objemných materiálů s vyšší plošnou hmotností musí být zajištěna dobrá pórovitost vytvořeného materiálu pro možnost migrace buněk do jeho vnitřních částí. O tomto referoval již Li, W. J. et al. (2005), který řešil výrobu materiálu s ohledem na jeho strukturní parametry. Tan, S. H. et al. (2005) hledal další technologické možnosti výroby pro zlepšení migrace buněk. Podle Tuzlakoglu et al. (2005) je v případě objemných materiálů nejdůležitější penetrace buněk do celého objemu scaffoldu, tj. zajištění optimálních podmínek nejen na povrchu, ale i uvnitř materiálu. Ve výsledku studie je definována určitá, přesně daná porozita nanovláknenného materiálu. Vzhledem k velikosti pórů je nezbytně nutné dopravovat živiny a další potřebné látky do celého objemu vláknenné struktury a současně zajistit buňkám dostatečnou oporu pro adhezi a následný růst. Struktura materiálu umožňuje místům s nižší plošnou hmotností snadnější penetraci buněk Ma, Z. et al. (2005). Vše je určeno velikostí mezivláknenných pórů a tím, že místa s vyšší plošnou hmotností působí jako rigidní členy pro mechanickou pevnost.

Materiály byly testovány i na mezenchymální kmenové buňky, viz Pan and Jiang (2006), především byla sledována migrace buněk dovnitř daného materiálu. Dalším parametrem byla vhodná diferenciace kmenových buněk v daném materiálu. Materiál ovlivňuje chování kmenových buněk a je nutné ho přesně specifikovat pro daný typ nahrazované tkáně, jak uvádí Schindler et al. (2005).

V návaznosti na materiály je potřeba zmínit také novou technologii výroby koaxiálních vláken. Tato technologie výroby vláken jádro-plášť je popsána např. ve člancích Hong, Y. L. et al. (2005), Dong et al. (2004). Autoři uvádějí možnosti vytvoření vlákna sestávajícího ze dvou různých polymerů nebo složek, které budou spojeny v jeden celek. Následně je zmiňována možnost inkorporace různých složek pro tkáňové nosiče. Při vhodně zvoleném biologickém nebo chemickém aditivu je takto vyrobený materiál optimální pro regenerativní medicínu a tkáňové inženýrství, zejména z důvodu uvolňování dané složky, která se nachází v jádře koaxiálního vlákna, viz Katti et al. (2004). Vzhledem k rychlosti degradace nosného polymeru, tedy obalu, lze uvolňování účinné látky v jádře nanovláken řídit.

Materiálová stránka výroby nanovláken je v současnosti určována polymerními materiály a zvláknitelností daného polymerního roztoku do formy mikro- nebo nanovláken. Inkorporace nanočástic a obecně částic do polymerů je přístup, který se používá v mnoha materiálních oblastech vědy, viz Capadon (2007). Inkorporace umožňuje vytvářet materiály s novými nebo zlepšenými vlastnostmi homogenizací více různých složek a využitím synergických efektů. Zajímavou možností je návrh nových funkčních materiálů s jedinečnými elektronickými vlastnostmi, katalytickou aktivitou, atd. Využití polymerních nanokompozitů je však limitováno nedostatkem efektivních metod kontroly dispergace nanočástic a mikročástic.

Polymerní materiály s vhodnou molekulovou hmotností je nutné rozpustit. Výběr vhodného rozpouštědla nebo rozpouštědlového systému jako nosiče konkrétního polymeru je základem optimalizace elektrostatického zvlákňování. Výběr rozpouštědla je stěžejní při stanovení kritické minimální koncentrace roztoku, jak je uvedeno v práci Luo (2010). Koncentrace roztoku je klíčová pro přechod od elektrostatického rozprašování k elektrostatickému zvlákňování. Rozpouštědlový systém výrazně ovlivní zvláknitelnost polymerního roztoku a morfologii vláken Andradý (2008). Práce Luo (2010) ukazuje, že rozpouštědla s vysokou rozpustností pro daný polymer nemusí nutně vytvářet roztoky vhodné pro elektrospinning.

Následně byly testovány binární systémy rozpouštědel pro výrobu vláken s vysokou pórovitostí povrchu, což ukazuje, že vysoká těkavost a vysoký rozdíl tlaku par mezi směsnými rozpouštědly mohou vyvolat separaci fází elektrostatického zvlákňování. To dokazuje, že separace fází může být indukována rozdílem rozpustnosti v roztoku polymeru.

Nanovlákná a jejich výroba jsou v současné době na samém vrcholu, materiály i polymery jsou přesně definovány, jak je tomu například při využití kombinace polykaprolaktonu a želatiny pro vytvoření materiálu pro tkáňové inženýrství. V publikaci Gautam (2013) popisuje přípravu kompozitní nanovláknenné vrstvy – textilní nosič scaffold již byl v textu použit bez vysvětlení za použití nové efektivní směsi rozpouštědel: chloroform / metanol pro polykaprolakton (PCL) a kyseliny octové pro želatinu. Gautam (2013) tak dokumentuje možnost kombinace rozpouštědlových systémů pro daný polymer a současně kombinace dvou polymerů, což znamená významný posun v oblasti nanovláknenných materiálů.

Funkcionalizace materiálů a následné řízené uvolňování dodaných látek je způsob, jak ovlivnit rychlost regenerace tkání, nebo jak řízeně uvolnit danou látku v přesně specifikovaném časovém období. V současnosti již existuje možnost funkcionalizace vytvořených nanovláken - mikrovláken z předem definovaného polymeru nebo kopolymerů. Lu (2016) ve své práci popisuje přípravu bikomponentního vlákna metodou elektrostatického zvlákňování. Jedná se o koaxiální metodu pro přípravu nanovláken jádro-plášť. Koaxiální vlákna se specifickými látkami, léčivy zapouzdřenými v jádře, mohou vykazovat trvalé a řízené uvolňování v čase. Vysoký specifický povrch nanovláken a vhodná trojrozměrná nanovláknenná struktura připomínají nativní extracelulární matrix. Tyto vlastnosti koaxiálních vláken ukazují, že mají obrovský potenciál v oblasti aplikací léků a tkáňového inženýrství.

Proteiny, růstové faktory, antibiotika a mnoho dalších látek byly úspěšně zapouzdřeny do koaxiálních vláken pro řízené uvolňování léčivé látky. Hlavní výhodou konstrukce koaxiálních vláken, tj. jádro a plášť, je, že po elektrostatickém zvlákňování zůstávají tyto látky bioaktivní díky ochraně pláštěm vlákna. Aplikace koaxiálních vláken mohou být scaffoldy pro tkáňové inženýrství, a to pro kostní tkáň, chrupavka, srdeční tkáň, kůže, cévy krevního řečiště a nervové tkáně. Novinkou je inkorporace proteinů, růstových faktorů, antibiotik a dalších látek ve formě léčiv. Využití koaxiálních vláken a nanovláken otevírá další možnost aplikace částic pro řízenou dopravu léčiva na přesně definované místo. V práci Tavares (2016) je popsáno cílení nanočástic s léčivem u maligních tkání pro lepší diagnózu a terapii.

V literární rešerši z roku 2007 je následující informace: „pouze medián, tedy 0,7% podané dávky nanočástic je dodáno přímo do trvanlivého nádoru.“ V publikaci byla provedena multivariační analýza dat pro definici a odhad fyzikálně-chemických parametrů nanočástic určených pro modely nádorů a analýza typů nádorových onemocnění. Výsledkem je z pohledu nádorové biologie zvýšená permeabilita, retenční účinek a fyzikálně chemický transport nanočástic.

Nanočástice jsou při uvolnění zachyceny mononukleárními fagocytárními a renálními systémy. To může představovat řešení problému nanočásticemi a klinický posun materiálů směrem do praxe může být urychlen.

Provedená rešerše se zaměřuje na výrobu nanovláken a jejich využití pro tkáňové inženýrství. Jsou zde uvedeny možné modifikace materiálů pro dosažení lepšího fyzikálně chemického transportu účinných látek, např. léčiv. Na závěr této kapitoly uvedu citát, který asi nejlépe popisuje současný stav.

„Technologie pro výrobu vláknenných - nanovláknenných materiálů i inkorporaci látek již známe, nyní je zejména nutná aplikace těchto vláknenných a nanovláknenných materiálů do praxe.“

Seeram Ramakrishna, konference Nart Liberec 2017.

Komentář k uveřejněným vědeckým pracím

V této části práce jsou prezentovány výsledky, ve kterých jsem uveden jako autor, nebo jako spoluautor. Hlavní přínos těchto prací je možné spatřovat zejména v oblasti textilní technologie, tj. výroby nanovláken. Publikované vědecké práce navazují na předchozí doktorskou práci, ve které jsem se věnoval speciálním kolektorům pro řízené ukládání nanovláken. V dané oblasti výzkumu i nadále pokračuji a předkládám soubor komentovaných vědeckých článků.

Článek s názvem: **Elastic three-dimensional poly(epsilon-caprolactone) nanofibre scaffolds enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells** popisuje možnosti přípravy nanovláčenných nosičů. Nanovláčenné vrstvy se připravují jako plošné materiály, což není zcela optimální struktura pro buněčnou proliferaci. Přínosem mnou vyvinutého materiálu je vytvoření strukturně modifikované vrstvy. Hlavním cílem vědecko-výzkumné práce bylo, zaměřit se na kontrolované ukládání nanovláken na přesně definovaná místa a tím vytvořit strukturu s definovaným vzorem - skladbou. Právě definovaný vzor pomůže buňkám lépe migrovat a proliferovat do struktury, přičemž vrstva zůstává přesto mechanicky odolná. Takto vytvořené vrstvy jsou netradiční a předložená publikovaná práce potvrzuje vhodnost nanovláčenných vrstev pro tkáňové inženýrství.

Požadavkem od biologů bylo vytvořit ideálně takovou strukturu, která bude vhodná pro pohodlné nasazení buněk a současně dovolí buňkám penetrovat dovnitř nanovláčenného materiálu - buněčného nosiče. Tento požadavek byl řešen pomocí vhodného biodegradabilního a biokompatibilního polymeru a přípravou různých plošných hmotností a hustot nanovláčenných vrstev pomocí speciálního kolektoru. Vrstvy tak umožňují snadnější prostup buněk přes místa s nižší plošnou hmotností. Tyto vrstvy mají, ale nízkou mechanickou odolnost a zároveň nízkou rozměrovou stabilitu. Proto navrhovaná vrstva obsahuje místa armovací, tedy místa s vyšší plošnou hmotností a tloušťkou. Ty vedou k lepším mechanickým vlastnostem a ke snadnější práci biologů s tímto materiálem. Vytvořením kombinace míst s různou plošnou hmotností (volbou vzoru) bylo dosaženo pomocí vhodných parametrů pro vytvoření 3D scaffoldů pro následnou buněčnou kultivaci in vitro. Materiály byly úspěšně testovány mezenchymálními kmenovými buňkami na 2. Lékařské fakultě Univerzity Karlovy.

Dále uvádím patent – číslo 305569, který doplňuje publikovaný článek. Referuje o možnosti výroby a aplikaci nanovláknenných materiálů ve formě třídimenzionálního (3D) scaffoldu. Důvodem je skutečnost, že biologické tkáně nejsou jen plošné útvary jako např. kůže, ale struktury třídimenzionální. Proto je nutné vytvořit vhodnou 3D strukturu, podobající se nativní tkáni. Je možné využít strukturovaný kolektor, který musí být vytvořen z vodivých částí. Pokud je kolektor strukturovaný, avšak vytvořený z nevodivého materiálu, např. silikonu, pak se využívá technologie popsaná v patentu: Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken a způsob pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken.

Přínos patentu vidím zejména v kombinaci výroby nanovláken a vlivu proudícího vzduchu. Předmětem patentu je produkce nanovláken, která se při svém pohybu směrem od zvlákňovací elektrody vychýlí proudem vzduchu směrem ke kolektoru, na který se následně uloží. Na povrchu tvarovaného předmětu se nanovláknena ukládají do vrstvy, která přesně kopíruje tvar předloženého vzoru. Takto se dají ukládat nanovláknena i na nevodivé předměty a povrchy, čímž lze docílit povrstvování složitých strukturních předmětů. Tento patent byl již použit pro vytvoření náhrady umělé srdeční chlopně. Finální vláknenný produkt byl vytvořen povrstvením silikonové předlohy chlopně.

Také je zde nutné zmínit český patent (27202) s názvem **3D kompozitní materiál určený především jako biodegradabilní náhrada chrupavky**. Patentová ochrana se týká materiálu, který slouží pro náhradu kloubní chrupavky. Použitý materiál je na bázi nanovláken s různou plošnou hmotností a s definovaným vzorováním v ploše nanovláknenné vrstvy. Vytvoření takto strukturovaných vrstev je můj přínos v tomto patentu. Nanovláknenné materiály byly vyrobeny pomocí speciálního kolektoru, který jsem navrhl a instaloval jej do stroje Nanospider, aby bylo dosaženo požadované vzorování. Nanovláknenná vrstva je propojena s vrstvami vytvořenými pomocí technologie 3D tisku. Výsledný materiál je tedy ve formě sendvičové struktury. Výsledky biologických testů takto připravených kompozitů jsou uvedeny ve článku: **The combination of 3D printing and nanofibers for tissue engineering of articular cartilage**. Chrupavka kolene je velice specifická tkáň, proto musí být biodegradabilní náhrada chrupavky z polymeru, který je mechanicky odolný a současně vhodný pro adhezi buněk. Technologie 3D tisku zde zajistí mechanickou pevnost a strukturované nanovláknenné vrstvy dobře podporují buněčnou adhezi.

Jak jsem již zmínil, struktura speciálního kolektoru hraje klíčovou roli ve tvorbě nanovlákných vrstev se vzorem a 3D stavbou. Publikace, která se věnuje zejména fyzikálnímu popisu a procesu elektrostatického (i elektrického) zvlákňování v blízkosti speciálního kolektoru, nese název **Production of Poly(vinylalcohol) Nanoyarns using a special saw-like collector**, a popisuje samotný proces výroby nanovláken z polyvinylalkoholu (PVA). Speciální kolektor, v tomto případě měděný hřeben, byl díky své geometrii a pravidelnému střídání vodivých elementů vybrán jako nejvhodnější. Experiment probíhal tak, že měděný hřeben byl umístěn jako kolektor proti zvlákňovací jehle. Zvlákňování z jehly umožňovalo sledování ukládání nanovláken na hroty měděného hřebenu. Nanovlákný materiál se ukládal na vrcholy vodivých hrotů a současně docházelo k orientaci mezi jednotlivými hroty vodivého hřebenu. Orientovaný vlákný svazek byl následně sejmut z povrchu vodivého hřebenu a zakroucen do formy příže. Pomocí mechanických zkoušek byla měřena pevnost příže v tahu, sledována vytvořená morfologie vláken pomocí elektronového mikroskopu.

Hlavním osobním přínosem této práce je objasnění fyzikální podstaty chování elektrického pole v blízkosti speciálního kolektoru, tj. měděného hřebenu. Provedená fyzikální analýza elektrického pole ukázala místa extrémů elektrické intenzity v blízkosti kolektoru. Mezi vodivými elementy speciálního kolektoru se vytváří silné elektrostatické pole, a proto dochází k řízenému ukládání nanovláken. Jednotlivá nanovlákná se v prostoru mezi vodivými elementy prodlouží, při morfologické analýze lze zjistit, že tato nanovlákná mají menší průměr než nanovlákná z jiných míst. Nanovlákná na vodivých místech se neprodloužila, a proto mají větší průměr než nanovlákná uložená mezi vodivými elementy. Modelování intenzity elektrického pole pomocí programu Comsol multiphysics potvrdilo fyzikální předpoklad, a díky tomu je možné graficky prezentovat místa s vyšší intenzitou pole. Přínosem práce je modelování intenzity pole, predikce míst, kde jsou na speciálním kolektoru uložena nanovlákná a také jejich výsledné uspořádání. Orientace a morfologie nanovláken byla potvrzena na základě optické mikroskopie.

Patent (304137) s názvem **Způsob výroby polymerních nanovláken zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli a lineární útvar z polymerních nanovláken vytvořený tímto způsobem** doplňuje výše citovaný článek a uvádí možnost praktického využití. Zde je popsána výroba polymerních nanovláken pomocí silového působení elektrostatického pole na polymerní roztok. Využívá se přítomnosti vysokého napětí, které je přivedeno na povrch volné hladiny zvlákňovaného roztoku.

Následkem silového působení vznikají místa nestability, které se dále mění na místa vzniku Taylorových kuželů. Následně z těchto míst dochází k výtrysku polymerní trysky, a další tvorbě nanovláken. Technologicky lze popsat střídavé zvlákňování jako vytváření kladně nebo záporně nabitých vlákenných vrstev nad zvlákňovací elektrodou. Na elektrodu s polymerním roztokem se přivádí střídavé napětí ze speciálního zdroje vysokého napětí. Při vysokém napětí vznikají nabité ionty, které se ve vzduchu pohybují a mohou unášet nanovlákná ve směru pohybu nabitých iontů. Tak se podle fáze střídavého napětí vytváří na zvlákňovací elektrodě polymerní nanovlákná s opačným elektrickým nábojem. Úseky s opačným elektrickým nábojem se po svém vzniku v důsledku působení elektrostatických sil shlukují do lineárního útvaru ve formě např. kablíku, který se volně pohybuje v prostoru ve směru gradientu elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody.

Vyhodnocení uspořádání vláken pomocí obrazové analýzy je popsáno v článku **Estimation of fiber system orientation for nonwoven and nanofibrous layers: local approach based on image analysis**. Předmětem publikace je analýza nanovláken a dalších textilních vrstev. Analýza textilních materiálů je nezbytně nutnou podmínkou pro stanovení kvality výsledného textilního produktu. Hodnocení finální kvality a analýza se lépe provádí u tkaných a pletených textilních materiálů. U nanovláknenných a mikrovláknenných materiálů je vyhodnocení vzhledem k malé velikosti průměrů vláken poněkud obtížnější.

Pro vyhodnocení submikronových vláken bylo nutné použít elektronový mikroskop, aby byl získán obraz požadované kvality a struktury vláken. Tento obraz bylo nutné pomocí statistických metod dále analyzovat a získat relevantní výstupy. Mezi hlavní hodnotící parametry u submikronových vláken byly zařazeny průměr vláken, anizotropie a směrové rozložení vláken. Výsledky přinášejí relevantní výstupy, ze kterých je možné vyvodit, jaké bude mít materiál geometrické vlastnosti, a jak se bude materiál chovat při mechanických zkouškách.

Vlastní přínos této publikaci je podle mého názoru zejména v oblasti technologie výroby nanovláknenných vrstev. Pomocí speciálních kolektorů a výběru vhodných polymerů bylo možno vytvořit požadované struktury. Jednalo se o orientované struktury, anizotropní struktury a také vrstvy, které obsahovaly kombinaci těchto dvou typů struktur. Všechny vlákenné vrstvy byly analyzovány na elektronovém mikroskopu a následně vyhodnoceny prostřednictvím obrazové analýzy.

Další vědecké práce, které zde budou zmíněny, jsou důležité zejména pro praktické technické aplikace, kdy dochází k provázanosti s klasickým textilním materiálem, s přízí a s plošnou textilií.

První z uvedených patentů (306428) nese název **Lineární vlákenný útvar s pláštěm z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar tvořící jádro, způsob a zařízení k jeho výrobě**. Lineární vlákenný útvar, tj. příze, je obalena nanovlákným pláštěm, zahrnuje tedy jádro tvořené nosnou přízí a plášť tvořený polymerními nanovláknami. Polymerní nanovlákná obalují nosnou přízi a tvoří její dokonalý obal. Nanovlákná vznikají z volné hladiny při zvlákňování vysokým střídavým elektrickým napětím. Nanovláknenný obal je kolem jádra (nosné příze) ovinut ve formě pásu ve tvaru šroubovice. Při způsobu výroby lineárního vlákenného útvaru se na zvlákňovací elektrodě, která je připojena ke zdroji střídavého napětí, vytváří nanovláknenná vlečka, která se ve zvlákňovacím prostoru mění na plochý pás s uspořádanou strukturou nanovláken. Nanovláknenná vlečka se přivádí k rotujícímu lineárnímu útvaru (nosné přízi), který slouží jako speciální délkový kolektor. Následně dojde k zachycení vlečky rotujícím lineárním útvarem a k dokonalému pokrytí povrchu nosné příze. Vlastní přínos je zejména v technologickém řešení výroby nanovláken a výběru vhodných polymerů pro dosažení vhodných mechanických vlastností nanovláken.

Ze článků, ve kterých je kladen důraz na technologii výroby meltblown, bych rád jmenoval článek s názvem **The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering**. Kompozitní materiál je tvořen klasickou netkanou technologií a to technologií meltblown, která pro výrobu mikrovláken využívá polymerní taveninu a horký stlačený vzduch. Vzhledem k průměrům vláken, které se pohybují okolo pěti mikrometrů, bylo nutné materiál meltblown kombinovat s technologií elektrostatického zvlákňování. Při kombinaci obou technologií zároveň je možné vlivem výrobnosti řídit poměry jednotlivých průměrů nanovláken, jak to ve své práci popisuje Thomas et al. (2006). Výroba různých průměrů vláken je vhodná zejména pro lepší adhezi buněk na vlákenný materiál, což publikoval také Shin et al. (2004). Dobrou adhezi představuje zejména zastoupení nanovláknenné složky, oproti tomu mechanické vlastnosti zajišťují vlákna meltblown, což ve své publikaci potvrzuje Li, C. M. et al. (2006). Technologie meltblown je v průmyslové sféře hojně využívána pro výrobu jednorázových zdravotnických prostředků, jemných struktur pro filtraci a vysoce savých materiálů. Vlastní přínos spočívá v použití biodegradabilního polymeru pro technologii meltblown, nalezení kombinace technologických parametrů pro melt blown a elektrostatické zvlákňování.

Výroba takového kompozitu je unikátní pro možnost řízené přípravy materiálů v oblasti tkáňového inženýrství. V současnosti nejsou tyto medicínské kompozity plošně využívány v průmyslu především pro vysokou cenu a složitost nastavení celého zvlákňovacího procesu. Bezesporně se jedná o materiálově a technologicky průlomový článek, což naznačuje také počáteční citovanost.

Obdobný článek s názvem **Cell penetration to nanofibrous scaffolds** je technologicky zaměřen na výrobu objemných materiálů a testování materiálů. Technologická výroba objemných vláknenných materiálů byla zaměřena na kombinaci dvou technologií s odlišnou výrobností. Cílem bylo potvrdit vhodnost kombinace těchto technologií pro tkáňové inženýrství, zejména sledování buněčného průniku do objemných materiálů. Ve tkáňovém inženýrství je infiltrace buněk kritickým parametrem pro příznivý vývoj 3D nanovláknenných nosičů. Aplikace nanovláken v tkáňovém inženýrství je nutnou podmínkou pro zlepšení buněčné adheze a růstu. Výhody nanovláknenných nosičů jsou zejména charakteristické rozměry vláken, pórovitost materiálů a možnost vytvářet požadované struktury pro vývoj scaffoldů. Technologické možnosti výroby dovolují transformaci průměrů vláken, ovlivnění pórovitosti materiálu a variaci výroby plošné hmotnosti. Výroba nanovláknenných nosičů je možná díky využití širokého spektra možných technologií. Vlastní přínos v tomto článku spočívá zejména ve výrobě materiálů, vzájemném propojení výrobních technologií a dosažení požadované struktury finálních vláknenných vrstev.

Modifikace vláknenných materiálu, založená na funkcionalizaci vláken a přidavku léčivé látky, se neustále vyvíjí. Podaná patentová přihláška popisuje přírodní látku, která je vhodná pro zlepšení hojení kožních poranění. Aditivum do vláken je na bázi přírodního léčiva. Patentová přihláška s názvem **Kryt kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, polymerní nanovláknena a/nebo mikrovláknena obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a způsob výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty** popisuje kryt kůže nebo rány, který obsahuje přírodní účinnou látku canabidiol (CBD) nebo jeho deriváty. Materiál obsahuje vrstvu nanovláken a mikrovláken z biologicky kompatibilního polymeru obsahujícího canabidiol nebo jeho deriváty. Tato látka se nachází na povrchu nebo ve hmotě nanovláken a mikrovláken. Přidaná účinná látka CBD omezuje zánět a urychluje proces hojení. Vlastní přínos této patentové přihlášky spočívá (i) v inkorporaci CBD do polymerního roztoku, (ii) v nalezení optimální koncentrace CBD nebo jeho derivátu v závislosti na zvláknitelnosti polymerního roztoku a (iii) v optimalizaci technologického procesu elektrostatického zvlákňování.

Vzhledem k velice slibným hypotézám předchozího článku byl na základě provedených experimentů a výsledků publikován článek s názvem **The combination of meltblown technology and elektrospinning – The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability**, který se zabývá kombinací dvou technologií pro výrobu vláken. Směšování mikro a nanovláken probíhá v jednom procesu a cílem je vytvoření takového materiálu, který podpoří životaschopnost buněk. Výsledky publikace navazují na technologický základ, tedy kombinaci technologie meltblown a elektrostatického zvlákňování, což studoval a publikoval již Tuzlakoglu et al. (2005). Cílem této publikace bylo potvrzení studie autora Tuzlakoglu a vyhodnocení vytvořených vlákněných struktur zejména pro náhradu kostních defektů.

Můj přínos v této publikaci spočívá cíleně dosažené struktuře kompozitu, tedy ve zvolení poměru mikrovláken a nanovláken a vytvoření biologie požadované struktury. Tím je možné ovlivnit mechanické vlastnosti výsledného tkáňového nosiče. V tomto případě byl použit biokompatibilní a biodegradabilní polymer polykaprolaktonu (PCL). Rychlost degradace vytvořeného kompozitu lze řídit poměrem nano a mikrovláken. Tímto experimentem byly potvrzeny výsledky Yoshimoto et al. (2003). Vytvořený kompozit je vhodný pro regenerativní medicínu, která se zabývá možnostmi regenerace kostní tkáně nebo chrupavky, jak uvádějí ve své publikaci Thomas et al. (2006). Následná možná funkcionalizace těchto materiálů povede k lepší aplikovatelnosti a využití v praxi.

Ryze technologickým patentem, který navazuje na předchozí impaktovaný článek nese název **Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná.**

Pro výrobu nanovláken je možné využít princip odstředivého zvlákňování nebo tradičního elektrického zvlákňování. Vytvořený objemný útvar (kompozit) je směsí mikrovláken a nanovláken. Kompozit se ukládá na povrch sběrného kolektoru, který může být ve formě pohyblivého pásu nebo rotačního bubnu. Tento kompozitní materiál se vyznačuje (i) velkým specifickým povrchem, (ii) vysokou sorpční kapacitou nanovláken a (iii) mechanickou stabilitou mikrovláken. Výhodou je možnost variace různých poměrů směsi vláken pro vytvoření vhodných vzorků pro další modifikace. Přínos tohoto patentu spočívá ve vytvoření unikátního kompozitního vlákněného materiálu. Pro výrobu se využívá dvou textilních technologií, které se použijí současně. Vzhledem k odlišné výrobnosti obou technologií je velice obtížné nastavení - směšování vláken pro vytvoření textilního kompozitu.

Pokud parametry technologie jsou špatně nastaveny, dochází k rozdělování jednotlivých vrstev, tzv. delaminaci. Přínos spočívá i v tom, že patent je podpořen předchozí impaktovanou publikací. V současné době hledáme komerční uplatnění takto vytvořených kompozitů.

Z pohledu textilního technologa uvádím další možnosti výroby vláken, které umožňují vytvořit koaxiální vlákna. Publikace s názvem **Needleless coaxial electrospinning: A novel approach to mass production of coaxial nanofibers** popisuje výrobu vláken, které je možné vyrábět koaxiální metodou. Vlákna se sestávají z obalu a jádra. V praxi se do jádra přivádí látka, kterou nelze zvláknit samostatně, protože není vláknatá. Je možné používat biologické polymery a např. léčivo, tento způsob vede k funkcionalizaci nanovláken. Výhodou je zejména možnost zvláknění polymerního roztoku nebo např. léčivé složky, která bude inkorporována v jádře. Nosným polymerem je plášť vlákna, který umožňuje při vhodném nastavení procesu koaxiálního zvláknění současně chránit jádrový polymer.

Unikátnost všech článků a patentů spočívá ve výrobnosti, tj. efektivitě výroby mikro a nanovláknenných materiálů. Jedná se o nanovláknenné a mikrovláknenné technologie, jejich vzájemnou kombinaci, popřípadě i další funkcionalizaci. Výzkum a technologie výroby, kterému se věnuji nejvíce, je zaměřen zejména na plošné vrstvy a objemné vrstvy.

Vědecký potenciál jednotlivce je možné hodnotit dle publikovaných impaktovaných článků a podle podaných patentů. V současné době je jedním ukazatelem hodnocení také realizace patentu nebo možná komerční aplikace. Proto uvádím možné využití vytvořeného materiálu, který je patentován, a který je koncipován pro léčbu kožních poranění.

Kůže je největší orgán lidského těla, jedná se o 1,5-2 m² ochranné vrstvy kožních buněk. Zranění kůže a kožní defekty se často dlouho hojí. V závislosti na kvalitě a rychlosti hojení je možné stanovit celkovou úspěšnost léčby. Proto uvádím vytvořený vláknenný materiál **Nanotardis**. V současné době probíhají klinické zkoušky, které zajišťuje Krajská nemocnice v Liberci, Nemocnice na Bulovce a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Zkouškou je nutné prokázat vhodnost toho nanovláknenného přípravku pro léčbu chronických a bércových kožních poranění na vybraném vzorku pacientů. Vědecko-výzkumný přínos mé práce je uveden v patentové přihlášce s názvem: **Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu**. Patentový nárok tohoto unikátního materiálu se týká technologie výroby nanovláknenné vrstvy, vyrobené z čistého biokompatibilního polymerního materiálu polykaprolaktonu (PCL).

Nanovlákná se ukládají na nosnou podkladovou netkanou textilií metodou stejnosměrného nebo střídavého elektrického zvlákňování (DC elektrosinning nebo AC elektrosinning). Nanovláknenná vrstva z PCL vyrobená elektrostatickým zvlákňováním, odstředivým zvlákňováním, technologií melt-blown nebo kombinací těchto technologií. Připravený vláknenný materiál napodobuje strukturu vrstvy kůže přiléhající k epidermis (pars reticularis koria). Materiál kožního krytu se zdá být ideálním základem pro reparaci a regeneraci kožní tkáně. Nanovláknenná vrstva z PCL je velmi flexibilní, a proto snadno přilne ke spodině rány. Nanovláknenné vrstvy vyrobené podle popsaného způsobu jsou vysoce porézní a tím, že umožňují přístup kyslíku ze vzduchu k léčené ráně, usnadňují a urychlují hojení. Struktura materiálu Nanotardis také znesnadňuje průchod bakterií.

Rozsah uvedených vědecko-výzkumných prací se nevěnuje striktně jen tkáňovému inženýrství a buněčným aplikacím, ale i aplikacím v ryze technické oblasti. Prvním takovým představeným výsledkem je **Vrstvený textilní materiál pro leštění tvrdých povrchů zahrnuje vrstvu netkané textilie a vrstvu nanovláken z polymeru polyvinyliden fluoridu**. Jedná se o patentovou přihlášku věnující se kompozitnímu materiálu, který je využit pro leštění skleněných čoček nebo zrcadel. Nanovláknenná vrstva obsahuje zabudované leštivo, které je uloženo v mezi vláknenných pórech. Velikosti částic leštiva se pohybuje od 0,04 μm do 500 μm . Leštivo ve formě prášku je rovnoměrně dispergováno v roztoku polymeru a následně dochází k tvorbě nanovláken. Leštivo je rozmístěno uvnitř i na povrchu vláknenného materiálu. Materiál neslouží k hlavnímu leštícímu procesu, ale zejména k tzv. finální operaci při leštění, a to dolešťování. Vlastním přínosem je vytvoření tohoto unikátního materiálu, který se využívá pro dolešťování povrchů a má využití v praxi.

Monografie s názvem **Physical principles of elektrosinning (Electrosinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)** kde prvním autorem je Lukas (2009), byla otištěna v žurnálu Textile progress. V uveřejněné monografii je zpracován přehledný pohled zejména na fyzikální aspekty působící na polymerní roztok vystavený vysokému napětí v elektrostatickém poli. V úvodu monografie je představena historie samotného elektrostatického zvlákňování. Následuje pohled ryze fyzikální, kde jsou analyzovány základy samotného procesu tak, aby byly jednotlivé procesy úspěšně převáděny do technologické praxe. Podstatou monografie je vysvětlení samoorganizace tekutin vystavených vysokému napětí, kdy je tato nestabilita vnímána jako důsledek jednotlivých rozdílných nestabilit, založených na elektrohydrodynamice polymerního roztoku.

Kapitola v monografii, jejímž jsem autorem, je kapitola č.5: Special collectors. Zaměřuje se na speciální kolektory a jejich vliv na ukládání nanovláken. Řízené ukládání nanovláken na podkladový materiál a řízení procesu je rozhodující při samotné výrobě orientovaných nanovlákných vrstev. Řízené ukládání poskytuje možnosti k vytvoření požadovaných struktur a vhodných plošných vrstev pro finální použití. Vlivem definované struktury samotného speciálního kolektoru je možné fyzikálně upravovat proces elektrostatického zvlákňování. Jedná se o silné elektrostatické síly v blízkosti speciálního kolektoru a také vlivu gradientu pole v blízkosti zvlákňovací elektrody. Všechny poznatky uvedené v této kapitole monografie byly uvedeny v předchozích impaktovaných článcích a patentech.

Dalším článkem, který zde předkládám, nese název **Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production**. Článek pojednává o povrstvování přízi nanovláknem tak, aby byla vytvořena funkční jádrová příze. Technologie využívá střídavého napětí (AC spinningu) pro výrobu nanovláken, která obalují nosnou přízi. Princip celé technologie spočívá v přepólování zdroje vysokého napětí, který generuje kladně nabitá nanovlákná a následně generuje záporně nabitá nanovlákná. Proto není potřeba kolektor, jako při stejnosměrném zvlákňování. Efektivita celého procesu výroby nanovláken je v porovnání se stejnosměrným napětím (DC spinning) větší. Vznikající vlákně se ukládá na nosnou přízi a celý útvar je dále odváděn k navíjecímu zařízení. Pomocí této metody je možné kontinuálně vyrábět jádrové příze, které jsou odolné na oděr a v praxi mohou fungovat zejména jako svíčkové filtry pro filtraci vody. Vlastní přínos tohoto článku spočívá především v přípravě polymerních roztoků optimálního složení a nastavení parametrů pro zvlákňování.

Na předchozí impaktovaný článek navazuje patent číslo 306428, který se zabývá provázaností nanovláken s klasickým textilním materiálem, s přízí nebo s plošnou textilií. **Lineární vlákněný útvar s pláštěm z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar tvořící jádro, způsob a zařízení k jeho výrobě** je název patentu, který popisuje lineární vlákněný útvar s nanovlákněným pláštěm a jádro tvořené nosnou přízí. Polymerní nanovlákná obalují nosnou přízi a tvoří tak její kompaktní plášť. Při způsobu výroby lineárního vlákněného útvaru se na zvlákňovací elektrodě napájené střídavým napětím vytváří nanovlákněná vlečka, která se ve zvlákňovacím prostoru změní na plochý pás s uspořádanou strukturou nanovláken. Tento pás se přivádí k obvodu jádrové příze, která rotuje ve zvlákňovacím prostoru kolem vlastní osy.

V patentu je současně popsáno celé zařízení k výrobě lineárního vlákenného útvaru. Obsahuje popis podávacího ústrojí pro nosný lineární útvar, zvlákňovací komoru, v níž je uspořádána jedna i více zvlákňovacích elektrod.

Patentově chráněná výrobní linka byla vystavena na Mezinárodním strojírenském veletrhu v Brně (10/2017). **Linka pro výrobu lineárního kompozitního materiálu s obsahem nanovláken** obdržela ocenění zlaté medaile za zařízení pro výrobu kompozitního materiálu s obsahem nanovláken pomocí zvlákňování ve střídavém elektrickém poli. Inovativní kompozitní vlákenný materiál vhodně kombinuje vlastnosti vláken nosného jádra příze, která zajišťuje požadovanou pevnost, společně s nanovlákný pláště, která dodávají materiálu jeho specifické vlastnosti. Princip výroby tohoto materiálu spočívá v novém způsobu tvorby nanovláken z polymerního roztoku pomocí střídavého elektrického zvlákňování (AC elektrospinningu), který je patentován na TUL. Vyvíjené lineární, a z nich vyrobené plošné i trojrozměrné kompozitní materiály, nacházejí uplatnění v různých aplikacích, jako je např. filtrace, čištění odpadních vod, medicínské aplikace, speciální technické textilie, atd.

Propojení vědeckých prací s inženýrskými poznatky.

Mezi inženýrské poznatky se řadí také patenty, užité vzory a další komerční výstupy. Níže jsou uvedeny záznamy z Úřadu průmyslového vlastnictví. Podmínky hledání pro všechny záznamy byly zadány následovně: přihlašovatel/majitel: Technická univerzita v Liberci, původce: Chvojka J. Zobrazí se 20 záznamů, které se vztahují k vědeckým pracím. V současné době je zde uvedeno celkem o 6 udělených patentů, 5 patentových přihlášek, 4 užité vzory, 4 zaniklé užité vzory a 1 evropský patent neúčinný. Jedná se o podpoření vědeckých publikací možným aplikačním výstupem a ochranou. Některé z těchto záznamů jsou uvedeny v předchozím textu. Jedná se o doložení provázanosti mezi vědecko-výzkumnou částí a praktickou možností aplikace. Zde bych uvedl výstup z oblasti zdravotnictví, kde se jedná o nanovlákněný kožní kryt.

Kožní kryt Nanotardis

Kožní kryt je určen jako kryt čistých akutních nebo chronických kožních defektů. S výhodou jej lze kombinovat s ostatními komerčně dostupnými produkty určenými k hojení kožních defektů. Výhodou jsou zejména (i) snadná aplikace zdravotnického prostředku, (ii) výborná splývavost materiálu umožňující dokonalé přilnutí k ráně, (iii) dobrá snášenlivost pro pacienty. Prostředek je pro klinickou zkoušku dodáván ve sterilním balení po jednotlivých kusech o rozměru 7 x 7 cm². Kožní kryt NANOTARDIS je vyroben z biologicky odbouratelného polyesteru s teplotou tání 58°C a teplotou skelného přechodu přibližně -72 °C. V současné době probíhá klinická studie ref.č. TUL 3/2016 na pacientech, kteří navštěvují Nemocnici na Bulovce, Krajskou nemocnici v Liberci a Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Výsledek bude uveřejněn po ukončení probíhajících testů.

Vlastním přínosem je výroba materiálů pro klinickou zkoušku, příprava dokumentů pro klinickou zkoušku, získání povolení GMDN pro SÚKL. Dále vytvoření: Příručky pro zkoušejícího zdravotnického prostředku NANOTARDIS podle EN ISO 14155, na které jsem se podílel 25%. Všechny požadované dokumenty byly předloženy orgánu pro schvalování zdravotnických prostředků, kdy následně bylo vydáno kladné rozhodnutí. Součástí příloh je kopie tohoto rozhodnutí. Dalším krokem ke komercializaci materiálu je certifikace CE pro nutnou výrobu zdravotnického prostředku a další možnost komercializace produktu. Po splnění vše požadavků bude materiál uveden na trh jako nanovlákněný kožní kryt pro léčbu čistých akutních nebo chronických kožních defektů.

Zdravotnický prostředek s názvem „NANOTARDIS“ je nanovláknenná netkaná textilie vyrobená z komerčně dodávaného polymerního granulátu označeného poly-ε-kaprolakton (PCL). Pro výrobu se používá patentovaná technologie označovaná jako elektrické nebo také elektrostatické zvlákňování. Kožní kryt je vyráběn na komerčně dostupném zařízení (Nanospider™). Tvorba nanovláken je řízený proces, kdy vlivem vysokého napětí jsou z polymerního roztoku formována jemná vlákna. Všechno rozpouštědlo se při tvorbě nanovláken odpaří a je odváděno s výrobním vzduchem ze zvlákňovacího prostoru stroje. Nanovláknenná vrstva je ukládána na podkladovou elektrodu, která je nejčastěji označována jako kolektor. Jako textilní technolog jsem byl zodpovědný za výrobu tohoto nanovláknenného prostředku, přípravy polymerního roztoku a nastavení všech podmínek pro dosažení požadovaných parametrů.

Vlastní přínos habilitační práce.

Habilitační práce má být propojením základního nebo aplikovaného výzkumu, aplikačních cílů (patentů a/nebo užitných vzorů) a dle eventualit navazujících na výzkum. Doplněna musí být zejména o pedagogickou činnost, která reflektuje směry výzkumné a aplikační činnosti. Celý text této habilitační práce je sepsán tak, aby provázal výzkumnou činnost současně i aplikační potenciál. Pedagogická část práce je uvedena v závěru této kapitoly.

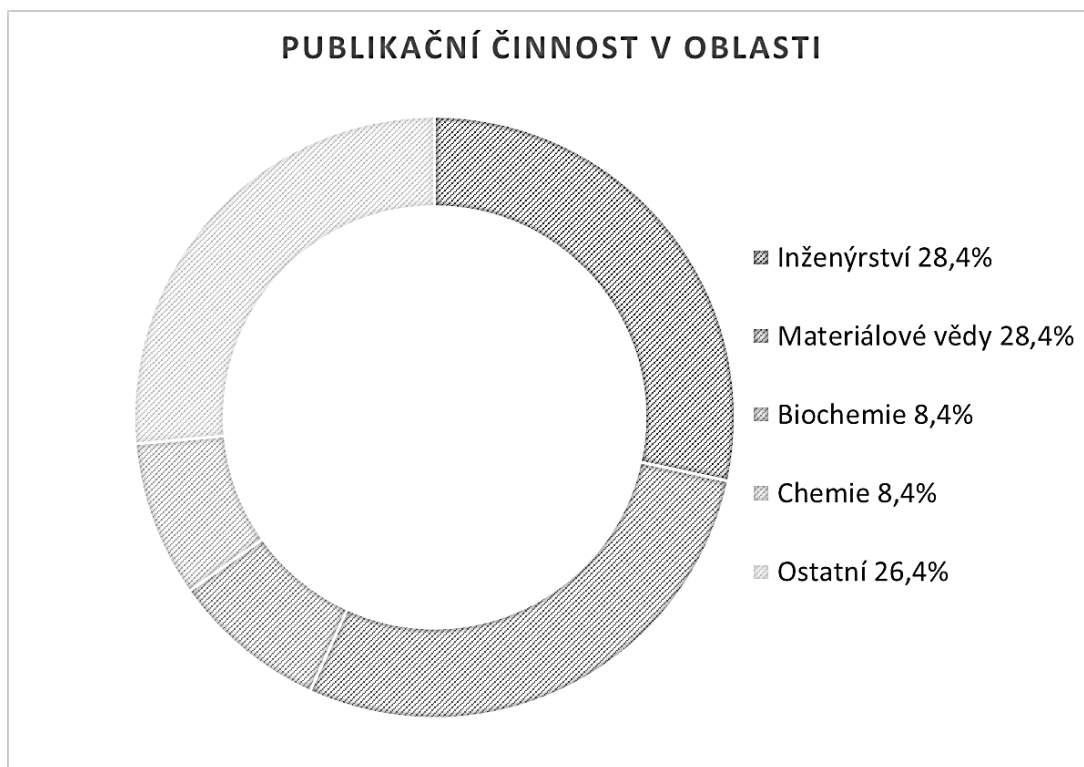
Osobním přínosem z pohledu textilního materiálového technologa vidím především ve výběru daného polymeru a přípravě polymerních roztoků. Dále přínos vidím v inovacích a zejména funkcionalizaci textilní vláknenné, mikrovláknenné nebo nanovláknenné vrstvy. Požadavky na tuto finální vrstvu jsou předem definovány vzhledem k specifickým konečným potřebám biologů a zdravotníků. Vytvořené vláknenné materiály, které byly popsány a uveřejněny v impaktovaných člancích, jsou současně podpořeny aplikačními patenty.

Nejdůležitější a nezbytně nutné je při výrobě polymerních vláken dodržet zejména technologické parametry. Jedná se o podmínky za (i) materiálové, jako je polymerační stupeň polymeru, koncentrace a vodivost roztoku a použitá rozpouštědla, za (ii) okolní podmínky, kterými jsou především teplota a vlhkost vzduchu. Procesní parametry jsou např. elektrické napětí, proud, vzdálenost kolektoru a finální mechanické vlastnosti materiálu. Nejvyšší nároky na připravené materiály jsou kladeny zejména ze strany biologických aplikací, tedy tkáňového inženýrství.

Technické aplikace vlákných, mikrovlákných a nanovlákných materiálů stále hledají nové možnosti nejen v oblasti filtrace, sorpce, elektrické izolace, vlákných kompozitů, ale také v dalších oblastech.

Patenty a užité vzory, které zde byly uvedeny, mají návaznost na projekty řešené na Katedře netkaných textilií a nanovlákných materiálů. Jedná se zejména o materiálovou stránku netkaných textilií, tedy vývoj a výrobu nových materiálů. Vyučované předměty jsou tematicky propojeny s publikovanými impaktovanými články a vědecko výzkumnou prací. Tematicky vedu předměty, kde jsem garantem, přednášejícím i cvičícím. Předměty, které vyučuji a garantuji, jsou tři: Termické a Chemické Technologie výroby NT (TCT) pro bakalářský studijní program, pro navazující magisterský program Termické a Chemické Technologie (TCTi) a předmět Zdravotnické textilie (ZDT).

Vedené doktorské, magisterské i bakalářské práce se vždy zaměřují tematicky na VaV. Současně jsou vázány na některé řešené projekty a na oblasti mého osobního zájmu a výzkumu. Celkem jsem vedl 8 (osm) doktorských prací, obhájena zatím nebyla žádná. Úspěšně jsem vedl ukončených 6 (šest) magisterských prací a bakalářských prací 11 (jedenáct).



Závěr a poděkování:

Jako vedoucí katedry Netkaných textilií a nanovláknenných materiálů vidím další dílčí cíle vývoje zejména na technologickou stránku výroby netkaných textilií, nanovláken a textilní vláknennou materiálůvou stránku. Výroba a příprava materiálů pro tkáňové inženýrství, funkčním materiálům pro zdravotnické a technické aplikace je nezbytně nutná. Budoucnost osobního výzkumu na KNT vidím v možnosti dalšího rozvoje klasických netkaných technologií a současně využití nových typů polymerních vláken. Aplikace biokompatibilních a biodegradabilních vpichovaných textilií pro vytvoření nových materiálů pro tkáňové inženýrství může být zajímavým směrem v kombinaci např. s hydrogely.

Kombinace více textilních technologií povede k synergickému efektu a možnosti vytvoření vláknenného kompozitu z recyklovaných surovin, např. pro automobilový průmysl. Využití recyklace u druhotných surovin a možnost jejich dalšího uplatnění v kombinaci s primárním materiálem povede ke snížení ceny finálního produktu.

Budoucností mého bádání může být také vývoj nové technologie, kterou v současné době KNT nedisponuje. Může se jednat o technologii kladení vláken vzduchem - air laid. Podobně se mohou vyrábět netkané textilie, kdy je využito tlaku nebo podtlaku vzduchu pro přípravu vhodné plošné vrstvy. Výsledné vrstvy vynikají vysokou savostí a bobtnavostí, kromě toho mají dostatečnou mechanickou pevnost. Plošné hmotnosti vláknenných vrstev se pohybují v rozmezí mezi 60-200 g/m². Z finančního hlediska je technologie dostupná, lze ji velmi dobře optimalizovat pro studijní i praktické účely.

Na závěr děkuji všem členům KNT za podporu, Poděkování patří také prof. Lukášovi za životní zkušenosti, které mi předal. Nakonec bych rád poděkoval celé své rodině, zejména manželce Martině, která mi poskytuje obrovskou podporu.

Literární zdroje:

Andrady, A.L., (2008). Science and technology of polymer nanofibers, John Wiley and sons, Inc., Hoboken, New Jersey.31-41

Boys, C.V. (1887). "Production properties, and uses of the finest threads." Physical society 23(145): 489-499

Capadona, J.R., Van Den Berg, O., Capadona, L.A., Schroeter, M., Rowan, S.J., Tyler, D.J. Weder, C., (2007). "A versatile approach for the processing of polymer nanocomposites with self-assembled nanofibre templates." Nature nanotechnology 2 (12): 765-769, DOI: 10.1038

Deitzel, J. M., J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. B. Tan (2001). "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles." Polymer 42(1):261–272.

Dong, H., V. Nyame, A. G. MacDiarmid, and W. E. Jones, Jr. (2004). "Polyaniline/poly(methyl methacrylate) coaxial fibers: the fabrication and effects of the solution properties on the morphology of electrospun core fibers." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 42(21):3934–3942.

Feynman R.P., Leighton R.B., Sands M., (2001) " Feynmanovy přednášky z fyziky 2." Pp 63-138, ISBN 80-7200-420-4, Fragment

Gautam, S., Dinda, A.K., Mishra, N.C., (2013) "Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method", MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS, 33(3): 1228-1235, DOI: 10.1016

Hansen, Ch. M. (2007). "Hansen solubility parameters a user's handbook"Second edition, Taylor&Francis Group, LLC, ISBN: 13:987-0-8493-7248-3, pp: 75-93

Hong, Y. L., T. C. Shang, Y. W. Jin, F. Yang, and C. Wang (2005). "Silica–polymer coaxial nanofibers." Chemical Journal of Chinese Universities (Chinese) 26(5):985–987.

Jirsak O., Sanetrik F., Lukas D., Kotek V., Martinova L., Chaloupek J., (2005) " A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method", PCT/CZ2004/000056, WO/2005/024101.

Katti, D. S., K. W. Robinson, F. K. Ko, and C. T. Laurencin (2004). "Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 70B (2):286–296.

Kessick, R., J. Fenn, and G. Tepper (2004). "The use of AC potentials in electrospraying and electrospinning processes." Polymer 45(9):2981–2984.

Kim, C. H., Y. H. Jung, H. Y. Kim, D. R. Lee, N. Dharmaraj, and K. E. Choi (2006). "Effect of collector temperature on the porous structure of electrospun fibers."Macromolecular Research 14(1):59–65.

Kim, G.-H. (2006). "Electrospinning process using field-controllable electrodes." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 44(10):1426–1433.

- Li, W.-J., R. Tuli, C. Okafor, A. Derfoul, K. G. Danielson, D. J. Hall, and R. S. Tuan (2005). "A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells." *Biomaterials* 26(6):599–609.
- Li, C. M., C. Vepari, H.-J. Jin, H. J. Kim, and D. L. Kaplan (2006). "Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials* 27(16): 3115–3124.
- Lu, Y., Huang, J.N., Yu, G.Q., Cardenas, R., Wei, S.Y., Wujcik, E.K., Guo, Z.H., (2016) "Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering", *Wiley interdisciplinary reviews-nanomedicine and nanobiotechnology* 8(5): 654-677, DOI: 10.1002
- Lukas D., Sarkar A., Martinova L., Vodsedalkova K., at.all. (2009) "Physical principles of elektrosponning (Electrosponning as a nano-scale technology of the twenty-first century) "Textile progress"41 (2): 59-140, DOI: 10.1080/00405160902904641
- Luo, C.J., Nangrejo, M., Edirisinghe, M. (2010) "A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning "POLYMER 51(7): 1654-1662, DOI: 10.1016
- Ma, Z. W., M. Kotaki, R. Inai, and S. Ramakrishna (2005). "Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds." *Tissue Engineering* 11(1–2):101–109.
- Mitchell, S. B. and J. E. Sanders (2006). "A unique device for controlled electrospinning." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78A (1):110–120.
- Morton W.J., (1902). "Method of dispersing fluids", Patent NO. 705.691
- Pan, H. and H. L. Jiang (2006). "Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide." *Biomaterials* 27(17):3209–3220.
- Shin, M., H. Yoshimoto, and J. P. Vacanti (2004). "In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold." *Tissue Engineering* 10(1–2):33–41.
- Schindler, M., I. Ahmed, J. Kamal, A. Nur-E-Kamal, T. H. Grafe, H. Y. Chung, and S. Meiners (2005). "A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture." *Biomaterials* 26(28):5624–5631.
- Tan, S.-H., R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna (2005). "Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process." *Polymer* 46(16):6128–6134
- Thomas, V., S. Jagani, K. Johnson, M. V. Jose, D. R. Dean, Y. K. Vohra, and E. Nyairo (2006). "Electrospun bioactive nanocomposite scaffolds of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for bone tissue engineering." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6(2):487–493.
- Tuzlakoglu, K., N. Bolgen, A. J. Salgado, M. E. Gomes, E. Piskin, and R. L. Reis (2005). "Nano- and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16(12):1099–1104.
- Wilhelm, S., Tavares, A.J., Dai, Q., Audet, J., Dvorak, H.F., Chan, W.C.W.,(2016) "Analysis of nanoparticle delivery to tumours. " *NATURE REVIEWS MATERIALS*, 1(5), DOI: 10.1038
- Zeleny J. (1914) "The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces". *Physical Review*. 3 (2): 69–91.

Souhrnná přehledná tabulka impaktovaných výsledků uvedených v habilitační práci

Bibliografická citace (ekvivalent J)	IF	Citace
Rampichova, M.; <u>Chvojka, J.</u> ; Buzgo, M.; et al.: Elastic three-dimensional poly (epsilon-caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells , CELL PROLIFERATION Volume: 46 Issue: 1 Pages: 23-37 Published: FEB 2013	5,039	55
<u>Chvojka, J.</u> ; Hinestroza, J. P.; Lukas, D.: Production of Poly (vinylalcohol) Nanoyarns Using a Special Saw-like Collector, FIBRES & TEXTILES IN EASTERN EUROPE Volume: 21 Issue: 2 Pages: 28-31 Published: MAR-APR 2013	0,677	7
Tunak, Maros; Antoch, Jaromir; Kula, Jiri; <u>Chvojka Jiri.</u> : Estimation of fiber system orientation for nonwoven and nanofibrous layers: local approach based on image analysis, TEXTILE RESEARCH JOURNAL Volume: 84 Issue: 9 Pages: 989-1006 Published: JUN 2014	1,613	13
Erben, Jakub; Pilarova, Katerina; Sanetnik, Filip; <u>Chvojka, Jiri</u> ,et al. : The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering, MATERIALS LETTERS Volume: 143 Pages: 172-176 Published: MAR 15 2015	3,019	18
Rampichova, Michala; Buzgo, Matej; <u>Chvojka, Jiri</u> ; et al.: Cell penetration to nanofibrous scaffolds, CELL ADHESION & MIGRATION Volume: 8 Issue: 1 Pages: 36-41 Published: JAN 1 2014	3,296	15
Erben, Jakub; Jencova, Vera; <u>Chvojka, Jiri</u> ; et al.: The combination of meltblown technology and electrospinning - The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability, MATERIALS LETTERS Volume: 173 Pages: 153-157 Published: JUN 15 2016	3,019	8
Vyslouzilova, Lucie; Buzgo, Matej; Pokorny, Pavel; <u>Chvojka, Jiri</u> ; et al.: Needleless coaxial electrospinning: A novel approach to mass production of coaxial nanofibers, INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS Volume: 516 Issue: 1-2 Pages: 293-300 Published: JAN 10 2017	4,213	15
Lukas David, Sarkar Arindam, Martinova Lenka; <u>Chvojka, Jiri</u> et al.: Physical principles of elektrosponing (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century,) Volume 41, Pages 59-140, Published: May 14 2009	Journals indexed in the ESCI	103
Pokorny, P., Kostakova, E., Sanetnik, F., Mikes, P., <u>Chvojka, J.</u> , Kalous, T., Bilek, M., Lukas, D.: Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production, PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS Volume: 16 Issue: 48 Pages: 26816-26822 Published: 2014	3,567	39

Seznam příloh:

1. Rampichova, M.; Chvojka, J.; Buzgo, M.; et al.: Elastic three-dimensional poly (epsilon-caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells , CELL PROLIFERATION Volume: 46 Issue: 1, Pages: 23-37 Published: FEB 2013 (IF 4,112)
Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken a způsob pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken.
3D kompozitní materiál určený především jako biodegradabilní náhrada chrupavky
2. Chvojka, Jiri; Hinestroza, J. P.; Lukas, David: Production of Poly(vinylalcohol) Nanoyarns Using a Special Saw-like Collector, FIBRES & TEXTILES IN EASTERN EUROPE Volume: 21 Issue: 2, Pages: 28-31 Published: MAR-APR 2013 (IF 0,626)
Způsob výroby polymerních nanovláken zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli a lineární útvar z polymerních nanovláken vytvořený tímto způsobem.
3. Tunak, Maros; Antoch, Jaromir; Kula, Jiri; Chvojka Jiri.: Estimation of fiber system orientation for nonwoven and nanofibrous layers: local approach based on image analysis, TEXTILE RESEARCH JOURNAL Volume: 84 Issue: 9 Pages: 989-1006 Published: JUN 2014 (IF 1,443)
Lineární vlákenný útvar s pláštěm z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar tvořící jádro, způsob a zařízení k jeho výrobě
4. Erben, Jakub; Pilarova, Katerina; Sanetnik, Filip; et al. : The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering, MATERIALS LETTERS Volume: 143 Pages: 172-176 Published: MAR 15 2015 (IF 2,572)
5. Rampichova, Michala; Buzgo, Matej; Chvojka, Jiri; et al.: Cell penetration to nanofibrous scaffolds, CELL ADHESION & MIGRATION Volume: 8 Issue: 1 Pages: 36-41 Published: JAN 1 2014 (IF 3,872)
Kryt kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a způsob výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

6. Erben, Jakub; Jencova, Vera; Chvojka, Jiri; et al.: The combination of meltblown technology and electrospinning - The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability, MATERIALS LETTERS Volume: 173 Pages: 153-157 Published: JUN 15 2016 (IF 2,572)
Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákna, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákna.
7. Vyslouzilova, Lucie; Buzgo, Matej; Pokorny, Pavel; et al.: Needleless coaxial electrospinning: A novel approach to mass production of coaxial nanofibers, INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS Volume: 516 Issue: 1-2 Pages: 293-300 Published: JAN 10 2017 (IF 3,649)
Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu.
8. Cévní náhrada, zejména maloprůměrová cévní náhrada
9. Vrstvený textilní materiál pro leštění tvrdých povrchů zahrnuje vrstvu netkané textilie a vrstvu nanovláken z polymeru polyvinyliden fluoridu Patent CZ2015-732A3
10. Lukas David, Sarkar Arindam, Martinova Lenka; et al.: Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century,) Volume 41, Pages 59-140, Published: May 14 2009 (IF Journals indexed in the ESCI)
11. Pokorny, P., Kostakova, E., Sanetnik, F., Mikes, P., Chvojka, J., Kalous, T., Bilek, M., Lukas, D.: Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production, PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS Volume: 16 Issue: 48 Pages: 26816-26822 Published: 2014 (IF 4,123)
12. Kožní kryt Nanotardis a jeho funkce, použití, rozhodnutí o povolení klinické zkoušky a návod k použití

Příloha č. 1

Rampichova, M.; Chvojka, J.; Buzgo, M.; et al.: Elastic three-dimensional poly (epsilon-caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells , CELL PROLIFERATION Volume: 46 Issue: 1, Pages: 23-37 Published: FEB 2013 (IF 4,112)

Patent: Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken a způsob pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken.

Patent: 3D kompozitní materiál určený především jako biodegradabilní náhrada chrupavky

Elastic three-dimensional poly (ϵ -caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells

M. Rampichová*,†, J. Chvojka‡,¶, M. Buzgo*,†, E. Prosecká*,†, P. Mikeš‡, L. Vysloužilová‡, D. Tvrđík§, P. Kochová**, T. Gregor††, D. Lukáš‡ and E. Amler*,†

*Laboratory of Tissue Engineering, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 40, Prague, Czech Republic, †Institute of Biophysics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, V Uvalu 84, Prague 5-Motol, 150 06, Czech Republic, ‡Technical University of Liberec, Faculty of Textile Engineering, Department of Nonwoven Textiles, Studentska 2, Liberec 1, 461 17, Czech Republic, ¶Technical University of Liberec, Institute for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation, Studentska 2, Liberec 1, 461 17, Czech Republic, §Institute of Pathology, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University, Studnickova 2, 12800, Prague, Czech Republic, **European Centre of Excellence NTIS – New Technologies for Information Society, Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, Univerzitni 22, 306 14, Pilsen, Czech Republic, and ††New Technologies – Research centre, University of West Bohemia, Univerzitni 8, Pilsen, 306 14, Czech Republic

Received 13 June 2012; revision accepted 17 August 2012

Abstract

Objectives: We prepared 3D poly (ϵ -caprolactone) (PCL) nanofibre scaffolds and tested their use for seeding, proliferation, differentiation and migration of mesenchymal stem cell (MSCs).

Materials and methods: 3D nanofibres were prepared using a special collector for common electrospinning; simultaneously, a 2D PCL nanofibre layer was prepared using a classic plain collector. Both scaffolds were seeded with MSCs and biologically tested. MSC adhesion, migration, proliferation and osteogenic differentiation were investigated.

Results: The 3D PCL scaffold was characterized by having better biomechanical properties, namely greater elasticity and resistance against stress and strain, thus this scaffold will be able to find broad applications in tissue engineering. Clearly, while nanofibre layers of the 2D scaffold prevented MSCs from migrating through the conformation, cells infiltrated freely through the 3D scaffold. MSC adhesion to the 3D nanofibre PCL layer was also statistically more common than to the 2D scaffold ($P < 0.05$), and proliferation and viability of MSCs 2 or 3 weeks post-seeding, were also greater

on the 3D scaffold. In addition, the 3D PCL scaffold was also characterized by displaying enhanced MSC osteogenic differentiation.

Conclusions: We draw the conclusion that all positive effects observed using the 3D PCL nanofibre scaffold are related to the larger fibre surface area available to the cells. Thus, the proposed 3D structure of the nanofibre layer will find a wide array of applications in tissue engineering and regenerative medicine.

Introduction

The goal of regenerative medicine is to replace damaged functional tissues or an organ with engineered material (1, 2) that will ultimately support, then become, a living surrogate. Scaffolds that support cell adhesion, proliferation and migration are needed, and hence, substances have been developed and tested for this purpose. Novel materials characterized by superb cell biocompatibility and suitable biomechanical parameters are in high demand in tissue engineering. In addition, the surrogate must allow ample supply of nutrition and adequate waste removal – this is vital for cell accommodation, proliferation, and/or differentiation. Consequently, appropriate scaffold structure with sufficient pore size for inherent circulation is essential for preparation of artificial tissues. Notably, optimal pore size requirement differs significantly between different size and type of cell. Pore sizes $>300\ \mu\text{m}$ have been recommended for vascularization in bone tissue

Correspondence: M. Rampichová, Laboratory of Tissue Engineering, Institute of Experimental Medicine, Academy of Science of the Czech Republic, Videnska 1083, 142 40, Prague, Czech Republic. Tel/Fax: +420 296 442 387; E-mail: m.rampichova@biomed.cas.cz

engineering (3), whereas fibroblasts have been demonstrated to prefer a pore size of 6–20 μm (4).

Several approaches have been reported for preparation of scaffolds of definitive pore size. Systems combining insoluble fibres and sacrificial (temporary) co-fibres have been reported (5, 6). Pores can be introduced into a solid support by salt particles that can subsequently be leached out (7), ice crystals (8), or photopatterning (9). After removal of sacrificial components, voids are introduced, and the appropriate scaffold pore size is obtained. Scaffolds based on fibrous structures are typified by favourable structural properties by several aspects, electrospun nanofibres, for example, being characterized by high porosity and an abundance of interconnected pores. Diameter of nanofibres is similar to that of natural fibres of the extracellular matrix (10, 11). In addition, nanofibre scaffolds exhibit high surface-to-volume ratio, facilitating cell adhesion and proliferation (12–15); due to this unique property, nanofibre scaffolds offer numerous contact points for cells.

Importantly, pore size of electrospun fibre mesh strongly correlates with diameter and orientation of fibres (16, 17); pore size usually decreases as diameter of fibres is reduced. Thus, preparation of finest fibre scaffolds is difficult and also unquestionably cell-specific. Ideal electrospun scaffolds should have nano- or microscale fibres with macroscale pores (10–500 μm) (18). These parameters permit population growth and differentiation of human mesenchymal stem cells (MSCs) towards osteoblasts (19, 20), amongst other things. Major limitations of a broader application of traditional electrospun scaffolds (for example, 2D fibrous scaffolds) remain their tightly packed layers, clearly, this hinders stem cell motion. Although we have recently demonstrated unaffected diffusion of molecules of up to 10 kDa in nanofibre meshes (21), structure of 2D fibrous mesh enables only superficial penetration of cultured cells (19, 22–24). Cell penetration into 3D scaffolds has been expected to be significantly enhanced.

Vaquette and Cooper-White prepared 3D structured nanofibre layers using several patterned collectors (25). Pore size enlargement and heterogeneous 3D distribution of pores in the structure enabled deeper cell infiltration into the scaffold compared to that observed in conventional electrospun layers. Milleret *et al.* prepared porous scaffolds from poly(lactic-co-glycolic acid) and the polyurethane Degrapol[®], using a co-fibre method (26). Increased porosity enhanced infiltration of seeded 3T3 fibroblasts, but no difference in cell proliferation was observed. 3D nanofibre structure in the form of a cotton ball-like scaffold has been prepared using ground spherical dishes and arrays of needle-like probes (18). The structure produced consisted of accumulated low-density nanofibres in an

uncompressed manner, which increased space for cell ingrowth, and resulted in higher rate of cell proliferation.

In our present study, we attempted to prepare 3D fibre scaffolds using a novel patterned cylindrical collector. We examined scaffold biomechanical and stereological properties and focused on effects of 3D fibre structure on adhesion, proliferation and differentiation of MSCs in the presence of osteogenic medium, and compared the findings to those observed using 2D scaffolds. Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) was chosen as the model polymer for this study. PCL is a biocompatible and Food and Drug Administration-approved material for biomedical applications. In addition, nanofibres from PCL have commonly been used to facilitate proliferation of MSCs (27–29).

Materials and methods

Scaffold preparation

2D PCL fibre materials (PCL 2D) were prepared using an electrospinning method. Molecular weight of PCL produced by Sigma Aldrich is 45 000 Da. electrospinning was performed using 14wt% PCL solution dissolved in chloroform:ethanol at a ratio of 9:1. A high-voltage source, Spellman SL 150, generates up to 50 kV, and polymer solution on the spinning electrode was connected to the positive pole of the high-voltage source. Electrospun fibres were deposited on a ground collecting electrode (rotating drum collector, approximately 60 rpm). Nanofibres were stored in a desiccator until used.

3D PCL fibre materials (PCL 3D) were prepared from PCL with the same molecular weight as those of PCL 2D. Polymer solution concentration was 14wt%, chloroform:ethanol at a ratio of 9:1 employed as solvent. The electrospinning setup is depicted in Fig. 1.

Two high-voltage sources were used to generate positive and negative potentials. The positive source was connected to a syringe needle, whereas the negative source was connected to a specific collector (described in the Results section, below); polymer pump 'KDS-100-CE' was used to feed the polymer solution. Voltage applied to the syringe needle was +46.5 kV, whereas voltage of –5 kV was applied to the collector. Distance between syringe needle and collector was 120 mm. Environmental conditions during the experiments were temperature 19.8 °C and relative humidity of 20%; processing time was 2 h for preparing compact 3D layers.

Scaffold characterization

Fibre layers prepared were visualized using an optical microscope (Olympus IX51, Tokyo, Japan) and also by

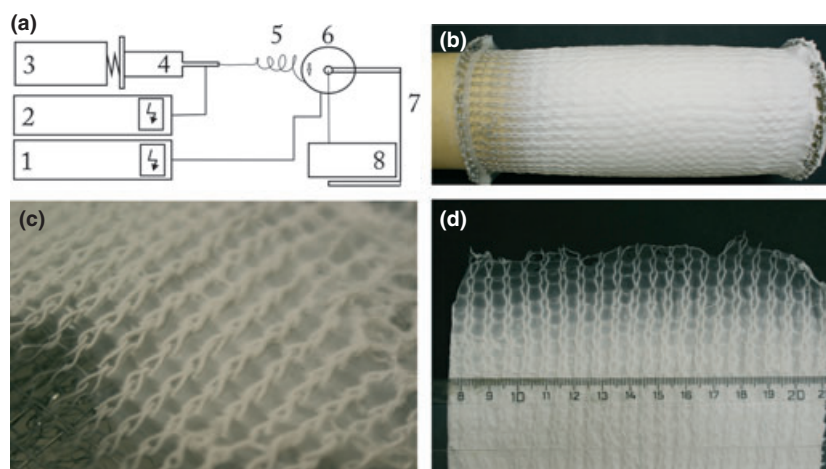


Figure 1. Electrospinning setup for the production of 3D nanofibres and macroscopic visualization of the prepared layers. Electrospinning setup for the laboratory production of PCL 3D (a) 1, high-voltage source; 2, high-voltage source; 3, feeding pump; 4, syringe with polymer; 5, nanofibres; 6, special collector; 7, frame for adjustment distances; and 8, electromotor. (b) The special collector is shown. The nanofibrous PCL 3D layer created by a special collector has a knitted-like structure (c and d)

scanning electron microscopy (SEM, Phenome G2; FEI, Eindhoven, The Netherlands). To quantify and describe fibre structures in detail, SEM photomicrographs were used and analysed using NIS Elements 3.0 software for image analysis. This software enables measurements of pore size, surface area and fibre diameter.

X-ray micro-tomography

X-ray micro-tomography is a non-destructive technique based on properties of absorption of X-rays by the scanned material. X-rays are absorbed by nuclei of atoms, and higher the atomic number, greater the X-ray absorption. The sample is rotating during scanning, while beams of transmitted X-rays are collected by the detector; so-called transmission images are generated at different angles of rotation. From these images, 3D structure of the scanned object is finally computed. Our micro-tomograph is capable of scanning with voxel size as small as 200 nm, depending on sample size and material. The general rule for obtaining best resolution is for the sample to be less than 500 times the resolution. Presented images were scanned on a Xradia XCT 400 at very low energy, 20 kV.

Profilometry

Profiles of 2D and 3D nanofibre layers was determined using an Alpha-step IQ mechanical profilometer (KLA Tencor, USA) with a diamond tip (Stylus, radius 10 μm , full angle 45°). Pressure force was 80 μN , sampling frequency 10 Hz and scan speed was 20 $\mu\text{m/s}$. Scanning scale was 550 μm (accuracy at the z-axis was

0.04 μm); average values were determined from 5 independent measurements.

Differential scanning calorimetry

Calorimetric measurements were performed using a DSC8500 apparatus (Perkin–Elmer). Purge gas (nitrogen, Waltham, MA, USA) passed through the DSC cell at flow rate of 20 ml/min and temperature of the equipment was calibrated using water, gallium and indium – the melting point of indium was used for calibrating heat flow. Samples with mass of approximately 6 mg were placed in pressure-tight aluminium pans and subjected to heating scan from 20 °C to 150 °C at 10 °C/min.

Melting temperatures (T_m) were determined from positions of the melting peaks. Degree of crystallinity (X_c) of the PCL nanofibres was calculated from melting enthalpy of PCL (ΔH_m), determined from area below the melting peak in the DSC thermogram, as

$$X_c = \Delta H_m / \Delta H_{\text{PCL}},$$

where ΔH_{PCL} is the melting enthalpy of fully crystalline PCL ($\Delta H_{\text{PCL}} = 139.5 \text{ J/g}$) (30).

Biomechanical testing

Twelve specimens of PCL 2D and 9 specimens of PCL 3D were loaded for tensile testing using Zwick/Roel traction apparatus equipped with a 1kN load cell, to obtain mechanical parameters, namely Young's moduli of elasticity, ultimate stresses and ultimate strains. Specimens

mens were thin strips of composite with 5 mm paper grips, prepared according to previous studies (31, 32). Initial length of all specimens was 10 mm of width also 10 mm. Thickness of individual specimens was measured using a digital caliper, and the values ranged from 90 μm up to 220 μm . Thickness of 3D PCL was measured at the thinnest region of specimens. Composites were loaded at loading velocity of 10 mm/min until the sheet of composite ruptured, according to earlier studies (31, 32). Young's moduli of elasticity were determined using linear regression analysis of stress-strain curves at strain of approximately 1–6% (depending on shape of the curve). Ultimate stresses and ultimate strains were determined at initiation of the rupture. Stress was defined as force divided by initial area, and strain was defined as elongation of the specimen divided by its initial length. Our own software written in Python, an Open Source object-oriented programming language, was used for the evaluation.

Isolation and culture of MSCs

Bone marrow aspirates were obtained from os ilia of anaesthetized miniature pigs (age 6–12 months, Institute of Animal Physiology and Genetics of the ASCR, Libechov, CZ). Animal care was in compliance with the Act of the Czech National Convention for Protection of Vertebrate Animals. Bone marrow was aspirated into 10-ml syringes with 5 ml Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) with 2% foetal bovine serum (FBS, StemCell Technologies) and 25 IU heparin/ml connected to a biptic needle (15G/70mm). Under sterile conditions, bone marrow (approximately 20 ml) was introduced into 50-ml centrifuge tubes, and 5 ml of Gelofusine (B. Braun Melsungen, Germany) was added. After 30 min incubation at room temperature, samples were centrifuged at 400 g for 15 min. Thus, the layer of mononuclear cells was removed and seeded into culture flasks and cultured at 37 °C in humidified atmosphere of 5% CO₂. α -minimum essential medium (MEM) with Earle's salt and L-glutamine supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (100 IU/ml and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively) was used as culture medium.

MSC seeding on scaffolds

Scaffolds 6 mm diameter and 2 mm thickness, were sterilized using low-temperature hydrogen peroxide gas plasma (Sterrad 100 S sterilizer, ASP, USA). Cells were seeded on scaffolds at $90 \times 10^3/\text{cm}^2$ density, in a 96-well plate, corresponding approximately to 25×10^3 cells/scaffold. Scaffolds with seeded MSCs were cultured in 250 μl differentiation medium per well

(α -MEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin (100 IU/ml and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively), 100 nM dexamethasone, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid 2-phosphate, and 10 nM glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate). Medium was changed every 3 days.

MSC penetration through nanofibre layers

Penetration of MSCs through 2D and 3D nanofibre layers was investigated. Sheets of nanofibres were cut and fixed in 24-well-plate inserts (Scaffdex, Finland). Bottoms of 24-well plates were covered by microscope glass, and inserts with nanofibres were placed in the wells. Cells at density of $90 \times 10^3/\text{cm}^2$ were seeded on nanofibre layers inside the inserts to prevent leakage of cells into surrounding areas. On days 1, 4, and 7, MSCs were visualized using fluorescence staining. Inserts with fibres were removed, and fibre sheets were excised. Samples and glass from bottoms of 24-well plates were rinsed in PBS (pH 7.4), fixed in frozen methyl alcohol (–20 °C) for 10 min, and rinsed in PBS. Subsequently, fluorescent probe 3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide (DiOC6; 0.1–1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS; pH 7.4) was added and incubated with the samples for 45 min at room temperature. Samples were rinsed in PBS, and propidium iodide (PI; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) was added for 10 min, followed by rinsing in PBS and visualization using a ZEISS LSM 5 DUO confocal microscope (PI: λ_{exc} = 561 nm, λ_{em} = 630–700 nm; DiOC6: λ_{exc} = 488 nm, λ_{em} = 505–550 nm).

Cell adhesion on scaffolds

DiOC6 staining was used to detect cell adhesion to scaffolds. Samples were fixed in frozen methyl alcohol (–20 °C) for 10 min and stained with DiOC6 and PI as described above. Specimens were visualized using the ZEISS LSM 5 DUO confocal microscope. Areas of adherent cells were counted using Ellipse software.

Cell viability analysis

Metabolic activity of cells was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Fifty microlitres of MTT (1 mg/ml in PBS, pH 7.4) was added to 150 μl of sample medium and incubated for 4 h at 37 °C. Then, 100 μl of 50% N, N-dimethylformamide in 20% sodium dodecyl sulphate (pH 4.7) was added. Results were examined using spectrophotometry in an ELISA reader at 570 nm (reference wavelength, 690 nm).

For detecting cell viability, live/dead staining (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoresceinacetoxymeth-

yl ester (BCECF-AM)/propidium iodide) and visualization using confocal microscopy were performed. BCECF-AM (diluted 1:100 in medium) was added, and cells were incubated for 45 min at 37 °C in atmosphere of 5% CO₂ for live cell detection. Cells were then rinsed in PBS (pH 7.4), and PI (5 µg/ml in PBS) was added for 10 min, after which cells were rinsed in PBS and visualized using the Zeiss LSM 5 DUO confocal microscope (PI: λ_{exc} = 561 nm, λ_{em} = 630–700 nm; BCECF-AM: λ_{exc} = 488 nm, λ_{em} = 505–550 nm).

Cell proliferation analysis using PicoGreen

The PicoGreen assay was performed using the PicoGreen assay kit (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) and proliferation of MSCs on scaffolds was tested on days 1, 7, 14, and 21. To process material for analysis of DNA content, 250 µl of cell lysis solution [0.2% v/v Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7.0), and 1 mM EDTA] was added to each well containing a scaffold sample. To prepare cell lysate, samples were processed through 3 freeze/thaw cycles; the scaffold sample was first frozen at –70 °C and thawed at room temperature. Between each freeze/thaw cycle, scaffolds were roughly vortexed. Prepared samples were stored at –70 °C until analysis. To quantify cell number on scaffolds, a cell-based standard curve was prepared using samples with known cell numbers (range, 1×10^2 – 1×10^6 cells). DNA content was determined by mixing 100 µl of PicoGreen reagent with 100 µl DNA sample. Specimens were loaded in triplicate, and fluorescence intensity was measured on a multiplate fluorescence reader (Synergy HT, λ_{ex} = 480–500 nm, λ_{em} = 520–540 nm).

Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufac-

turer's protocol. This kit is based on technology that combines selective binding properties of silica gel-based membranes with the speed of microspin technology. At the end of the procedure, total RNA was stored at –20 °C.

cDNA from 1 µg total RNA was used as template. Synthesis of cDNA was performed using a standard procedure described in our previous work (33). Osteocalcin (OC) and bone sialoprotein (BS) mRNA expression levels were quantified by means of LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using doublestrand-specific dye, SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's protocol. The complete list of primer sets, including their sequences and annealing temperatures, is presented in Table 1.

PCR conditions were initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 54 °C for 10 s, and extension at 72 °C for 20 s. Expression levels of OC and BS mRNA were adjusted, using level of beta-actin mRNA as housekeeping gene, and were expressed as ratio to beta-actin. Evaluation of mRNA expression of OC and BS was performed by quantitative real-time PCR analysis ($P < 0.05$, 2-sided *t*-test).

Detection of osteogenic markers using indirect immunofluorescence staining

Presence of OC, as marker of osteogenic differentiation, was confirmed using indirect immunofluorescence staining as described previously (34). In brief, samples were fixed in 10% formaldehyde/PBS for 10 min and incubated with the primary antibody against OC (mouse anti-OC, diluted 1:20, Abcam, US) for 1 h at room temperature. Then, secondary antibody (Alexa Fluor 635-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Invitrogen) was diluted 1:300 and added for 45 min at room temperature. OC staining was visualized using the ZEISS LSM 5 DUO confocal microscope.

Table 1. List of primers used for real-time PCR analysis

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	T _a (°C)	PCR product (in bp)
Beta-actin	Sense	AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA CC	53	332
Beta-actin	Antisense	GAA GTC CAG GGC GAC GTA GCA C	53	332
OC	Sense	TCA ACC CCG ACT GCG ACG AG	67	204
OC	Antisense	TTG GAG CAG CTG GGA TGA TGG	67	204
BS	Sense	CGA CCA AGA GAG TGT CAC	57	498
BS	Antisense	GCC CAT TTC TTG TAG AAG C	57	498

Each primer was chosen to span introns. The specific annealing temperature (T_a) of each primer and the size of the expected PCR products are listed below.

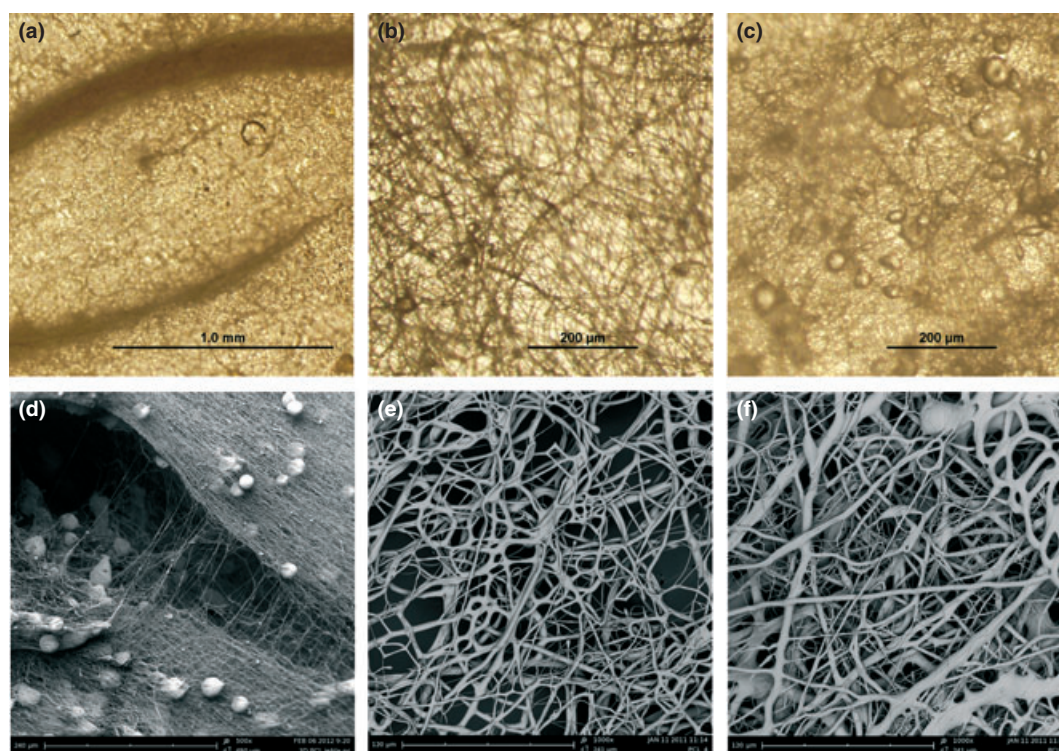


Figure 2. Visualization of nanofibrous PCL 2D and 3D layers. Optical microscopy (a,b,c) and SEM (d,e,f) were used for visualization of PCL 3D (a,b,d,e) and 2D (c,f) layers. 3D structure of PCL 3D layer is good visible (a,d) as well as bigger porosity in thin areas of PCL 3D layer (b,e).

Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean \pm standard deviation (SD). For *in vitro* tests, average values were determined from at least 3 independently prepared samples. Results were evaluated statistically using 1-way analysis of variance and Student-Newman-Keuls test. Normality of Young's moduli of elasticity, ultimate stresses and ultimate strains was tested using the Shapiro-Wilk W test. Differences in mechanical parameters between PCL 2D and PCL 3D specimens were determined using the Mann-Whitney U test. For both tests, Statistica base 9.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) was used.

Results

Novel collector and 3D scaffold characterization

The 3D nanofibre scaffold was prepared using a classic electrospinning setup (Fig. 1a) but with a novel special collector. The characteristic feature of the collector was that it was fitted with a rotating drum with a structured surface; a metal chain was employed for surface structure modification (Fig. 1b). The fibre scaffold was formed on the conductive metal strips of the rotating cylinder, and the pattern of the scaffold produced corre-

sponded to the structure of the collector surface (Fig. 1c). Thus, the newly formed scaffold was characterized with spots of different mass per unit area (weight of polymer per scaffold area), resembling a knitted structure (Fig. 1d). Clearly, the metal chain ensured formation of a 3D fibre scaffold characterized by unique properties and parameters.

To compare the novel 3D nanofibre scaffold with the classic 2D nanofibre scaffold, structures were examined using optical microscopy (Fig. 2a–c) and SEM (Fig. 2d–f). Optical microscopy identified that the 3D fibrous mesh consisted of more dense and less dense areas; morphology of 2D PCL was more homogenous. Ultrastructure of the fibres was visualized using SEM. Clearly, pore size differed between 2D and 3D samples. Visual analysis revealed that pores of 3D PCL were larger than those of 2D PCL. To quantify observed fibre arrangements, SEM photomicrographs were analysed using NIS Elements 3.0 software. Image analysis data of these PCL samples revealed a significant increase in average pore size area from $5 \mu\text{m}^2$ for 2D PCL to $10 \mu\text{m}^2$ for 3D PCL. However, within these average values were included significant contributions of very tiny pores of no importance for cell migration. Interestingly, maximum pore size increased from $20\text{--}30 \mu\text{m}^2$ for 2D scaffolds to more than $60 \mu\text{m}^2$ for 3D scaffolds. Nota-

bly, scaffold mass per unit area was identical for both types of sample.

Fibre diameters were similar in both 2D and 3D samples; average fibre diameter was $3.53 \pm 1.48 \mu\text{m}$ for 2D scaffolds and $2.91 \pm 0.91 \mu\text{m}$ for 3D fibres. For detailed analysis, fibres were separated into microfibrils ($\leq 1 \mu\text{m}$) and nanofibrils ($>1 \mu\text{m}$). Mean diameter of microfibrils in 2D mesh was $5.15 \pm 2.55 \mu\text{m}$, whereas nanofibrils had average diameter of $0.24 \pm 0.12 \mu\text{m}$. 3D nanofibrils had a mean diameter less than of respective 2D microfibrils ($2.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$) and nanofibrils ($0.14 \pm 0.21 \mu\text{m}$). Interestingly, when ratios between microfibrils and nanofibrils were estimated, 3D meshes had significantly more microfibrils ($66.5\% \pm 8.8\%$). In contrast, 2D scaffolds contained more nanofibrils, and proportion of microfibrils was just $36.9\% \pm 8.3\%$. From the data presented, it is apparent that our novel technique results in a more homogenous fibre mesh, despite being composed of more microfibrils.

Contact profilometry was used to measure samples' surfaces. Surfaces of 2D and 3D PCLs were scanned, and z-axis profiles were obtained. While z-axis profile of 2D PCL nanofibrils peaked at $70 \mu\text{m}$ (Fig. 3a), z-axis profile of 3D PCL revealed two distinct peaks with heights

around $240 \mu\text{m}$ (Fig. 3b). The peaks corresponded to dense components of the knitted-type structure. Results confirmed 3D nature of the prepared patterned scaffolds.

Additionally, three dimensional morphology of 3D PCL was also confirmed by X-ray micro-tomography. While in the case of 2D PCL, samples were predominantly planar (Fig. 4a), tomography of 3D PCL indicated elevation of structure in the dense areas (Fig 4b). Additionally, larger pore size of the 3D PCL mesh was clearly visible from the tomograph. Results support the observation that 3D PCL nanofibrils consist of less dense zones with higher porosity and more dense areas with tightly condensed nanofibrils.

Thermal properties of the 2D and 3D scaffolds were analysed using differential scanning calorimetry. Figure 5 (d) presents DSC thermograms of 2D PCL and 3D PCL nanofibrils. Melting point (T_m) of 2D PCL was 59.89°C , melting enthalpy (ΔH_m) being 88.66 J/g and degree of crystallinity (X_c) at 62.12% . Thermal properties of 3D PCL were almost identical to those obtained for 2D PCL: $T_m = 59.89^\circ\text{C}$, $\Delta H_m = 86.66 \text{ J/g}$ and $X_c = 62.12\%$. Results indicated similar thermal properties and identical physicochemical properties of 2D and 3D samples to each other.

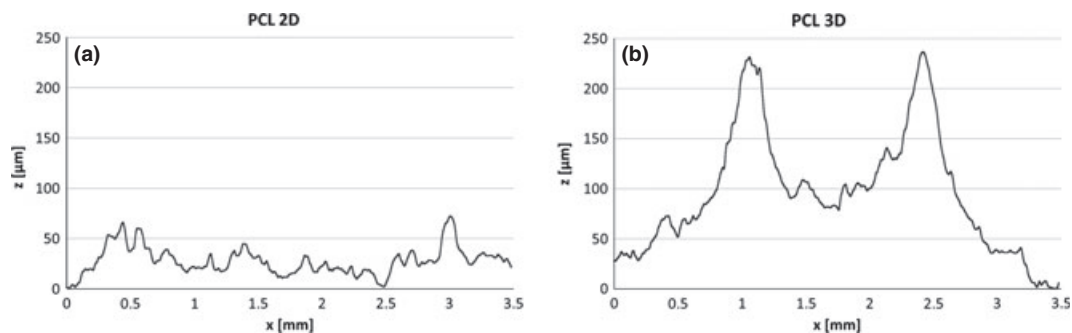


Figure 3. Surface topography of PCL 2D and 3D layers measured by contact profilometry. The heights of profilometer peaks of PCL 2D were not higher than $70 \mu\text{m}$ (b). On PCL 3D reached peaks almost $240 \mu\text{m}$ (a).

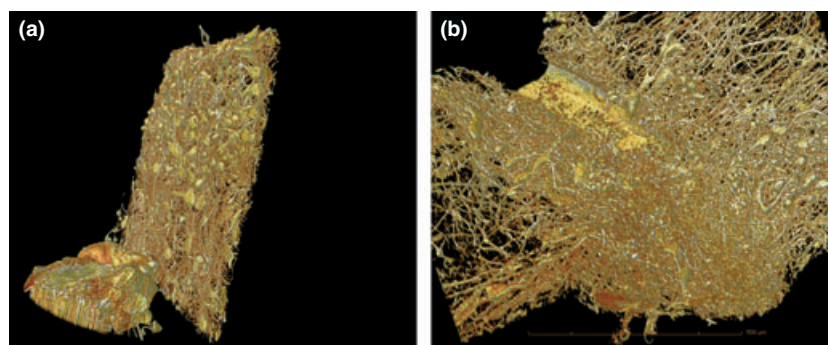


Figure 4. X-ray micro-tomography of PCL 2D and 3D layers. Micro-CT was used to visualize the structure of PCL 2D (a) and PCL 3D (b) samples. Difference in porosity on PCL 3D sample is clearly visible. The object in the bottom of image (a) is a part of sample fixation.

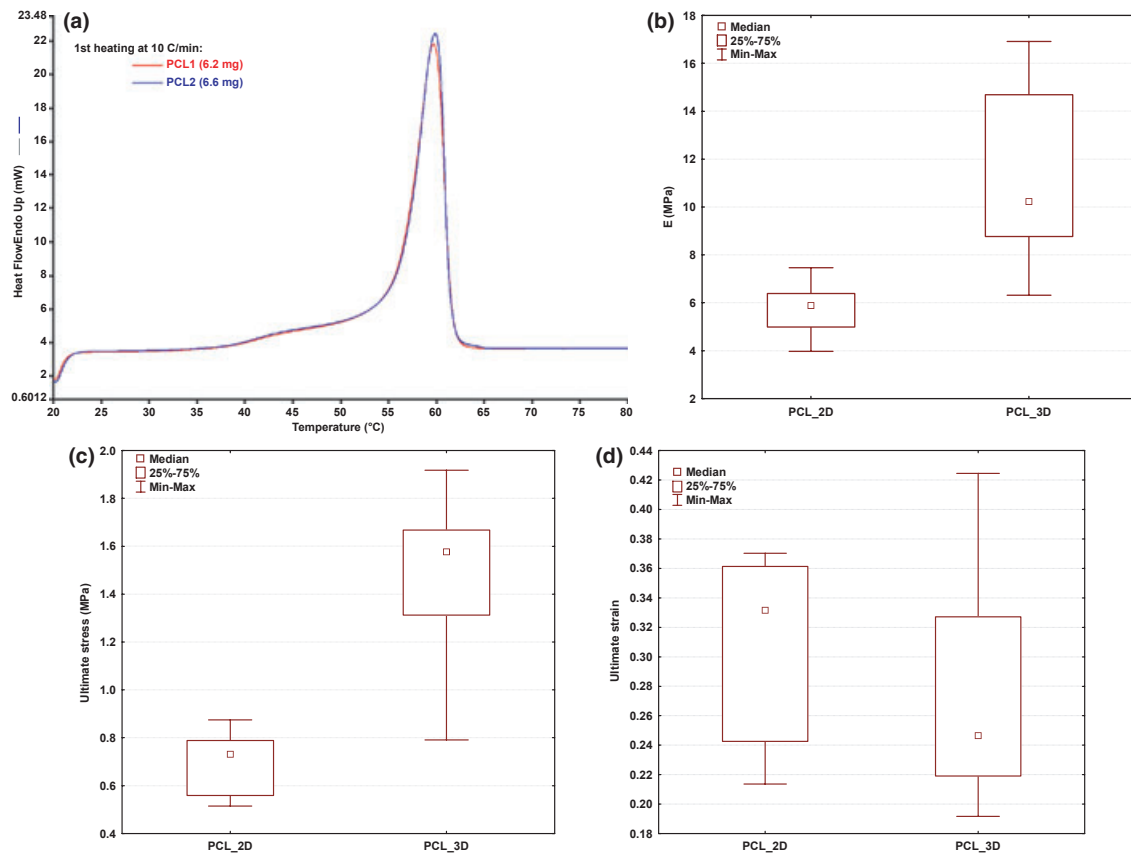


Figure 5. The mechanical and thermal properties of PCL 2D and 3D layers. No difference was shown in thermal properties of both samples (a). Significant differences between groups were found in the Young's moduli of elasticity (b) and ultimate stresses (c) (determined by Mann–Whitney *U*-test, $P < 0.001$). No significant difference was found in the ultimate strains (d) ($P = 0.24$).

To examine samples' mechanical properties, dynamic mechanical testing was performed. Results of these measurements demonstrated that in the case of 2D PCL, ruptures originated at a single point, typically in the middle of a specimen, and a single rupture line propagated perpendicularly to loading, while in the case of 3D PCL, ruptures originated in multiple locations; these rupture points occurred in thinner parts of the specimens. Dense locations held specimens together while thinner zones ruptured; with increasing load, dense parts also tore. Moreover, it was obvious that specimens with higher amounts of dense structures were stiffer than those with lower quantities of such structures.

Resultant Young's moduli of elasticity, ultimate stresses and ultimate strains are shown in Fig. 5. Mann–Whitney *U* testing showed that Young's modulus of elasticity of 2D PCL was significantly lower than that of 3D PCL ($P < 0.001$) (Fig. 5b). Ultimate stress was also significantly lower in the case of 2D PCL when compared to 3D PCL ($P < 0.001$) (Fig. 5c). No significant differences were observed for ultimate strain between

2D PCL and 3D PCL specimens ($P = 0.24$) (Fig. 5d). Obtained data clearly identified that 3D samples were more elastic and were firmer, despite having identical chemical composition to 2D samples.

3D PCL nanofibre scaffold facilitated MSC penetration through nanofibre layers

Undamaged 2D PCL scaffolds have been demonstrated (in our laboratory and others) to be tightly sealed and protective against cell incursion on obverse sides of scaffolds. However, higher average pore diameters of 3D scaffolds, as well as their unique stereology, were compared to 2D scaffolds, and questions concerning possible cell migration throughout 3D scaffolds arose. To address these notions MSC penetration through the 3D nanofibre layers was investigated.

MSCs were seeded on both types of nanofibre layer in a manner that prevented leakage of cells out to surrounding areas (for details, see Materials and methods section). MSCs were fluorescently stained and detected

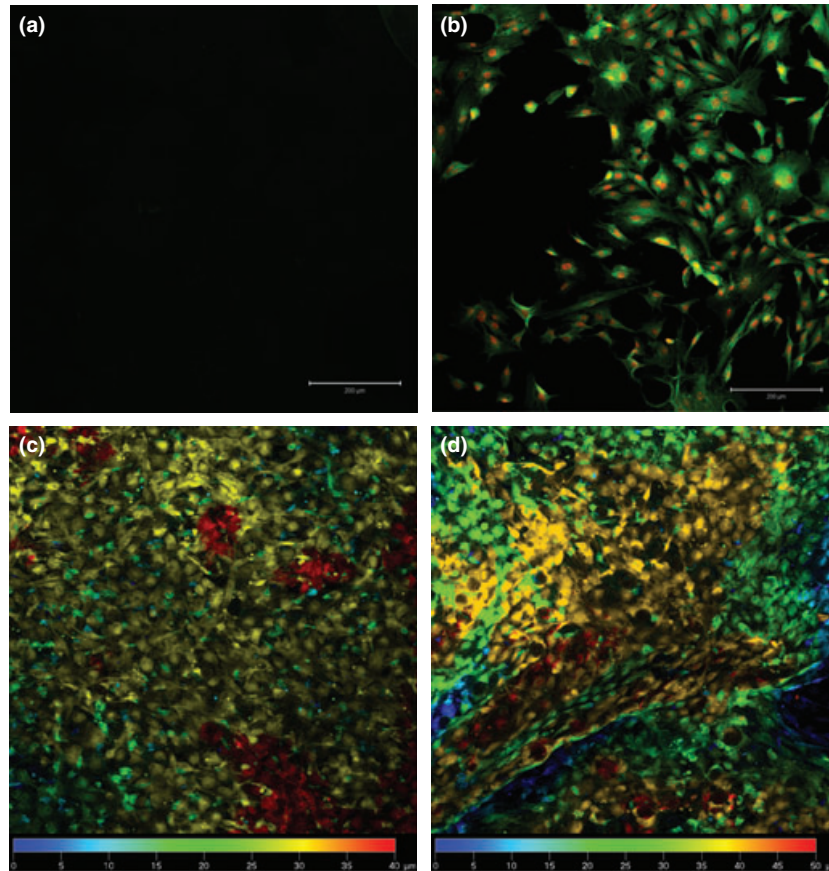


Figure 6. Confocal microscopic observation of penetrated cells. Confocal microscopic observation of cells penetrating through the nanofibrous layers of the 2D (a) and 3D (b) scaffolds on day 7; cells were stained using DiOC6 (green colour) and propidium iodide (red colour). Colour-coded projection of cells adhered to the 2D (c) and 3D (d) scaffolds on day 7.

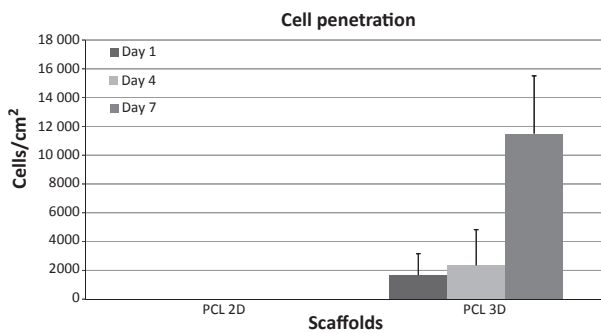


Figure 7. Penetration of MSCs through the nanofibrous layers. The number of MSCs penetrating through the nanofibrous layers was counted on 1, 4, and 7 days using the confocal microscopy images. The number of cells under the PCL 3D scaffold was increased over the 7 days. No cells penetrated through the PCL 2D scaffold.

using confocal microscopy, on days 1, 4 and 7 of the investigation. Cells attached to nanofibre scaffolds, as well as those attached to well bottoms, were visualized.

Visualization included information concerning cell diffusion through the scaffolds.

In accordance with our previous results, nanofibre layers of 2D scaffolds with average pore sizes of $5 \mu\text{m}^2$ prevented MSC migration through scaffold structures. This was clearly documented by absence of any fluorescence signal from well bottoms, even after 7 days seeding, whereas MSCs seeded on 3D samples exhibited strong fluorescence signals from these locations (Fig. 6a, c). A significantly different picture was observed for 3D scaffolds, here, cells were visible at bottoms of wells 24 h after seeding (Fig. 6b,d). Numbers of cells penetrating increased gradually during incubation periods (up to 7 days), proving our hypothesis that MSCs were able to work their way through 3D scaffolds (Fig. 7).

Metabolic activity of cells significantly increased on 3D PCL scaffolds

Both 2D and 3D PCL scaffolds have different potential applications. Thus, both were compared and tested for

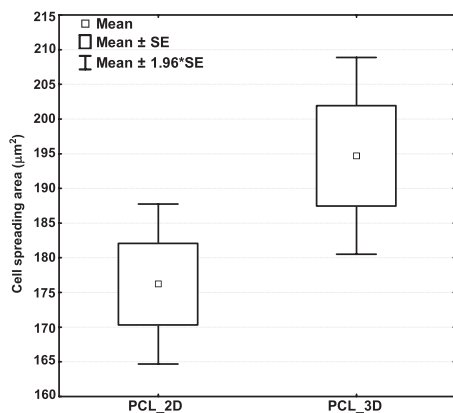


Figure 8. Cell adhesion. Cell adhesion was measured as the spreading area of cells 24 h after seeding. Cells were stained using DiOC6 and visualized using confocal microscopy. Images were analysed using the Ellipse software, and the spreading areas of cells were calculated (mean \pm standard deviation; $P = 0.45$).

MSC biocompatibility. MSC proliferation and viability were followed and tested for 21 days.

First, cell adhesion was measured 24 h after seeding. MSCs were stained using DiOC6, visualized using confocal microscopy, and areas of cell spreading measured. Interestingly, spreading area of cells cultured on 3D nanofibre PCL layers were statistically larger ($P = 0.045$) than those on 2D scaffolds (Fig. 8). We

attribute this observation to higher values between surface-to-volume ratio of 3D scaffolds compared to 2D scaffolds.

Cell seeding efficiency and proliferation were estimated from DNA values measured using PicoGreen assay (Fig. 9a). Cell seeding efficiency was counted as ratio of number of seeded cells (25×10^3 cells/scaffold) and number of cells on scaffold determined by PicoGreen assay, 24 h after seeding. Seeding efficiency was $59.4 \pm 4.61\%$ for 2D PCL and $44.3 \pm 8.64\%$ for 3D PCL. Results of PicoGreen assay on days 7, 14 and 21 clearly indicated substantial cell proliferation on both types of scaffold. Nevertheless, there were still significant differences observed between scaffolds. Cell number on 2D scaffolds increased gradually from 1 to 21 days; conversely, cells seeded on 3D nanofibres exhibited lower levels of proliferation between 1 and 14 days, but then cell number rapidly increased between 14 and 21 days ($P < 0.001$).

A similar pattern was observed with MSC viability as assayed by MTT testing (Fig. 9b). Cells grew well on both scaffolds for the first 14 days; however, viability considerably differed between 14 and 21 days. On the other hand, viability of MSCs on 2D scaffolds decreased during this period ($P = 0.019$), but a significant increase in metabolic activity was observed for MSCs seeded on 3D scaffolds ($P = 0.027$).

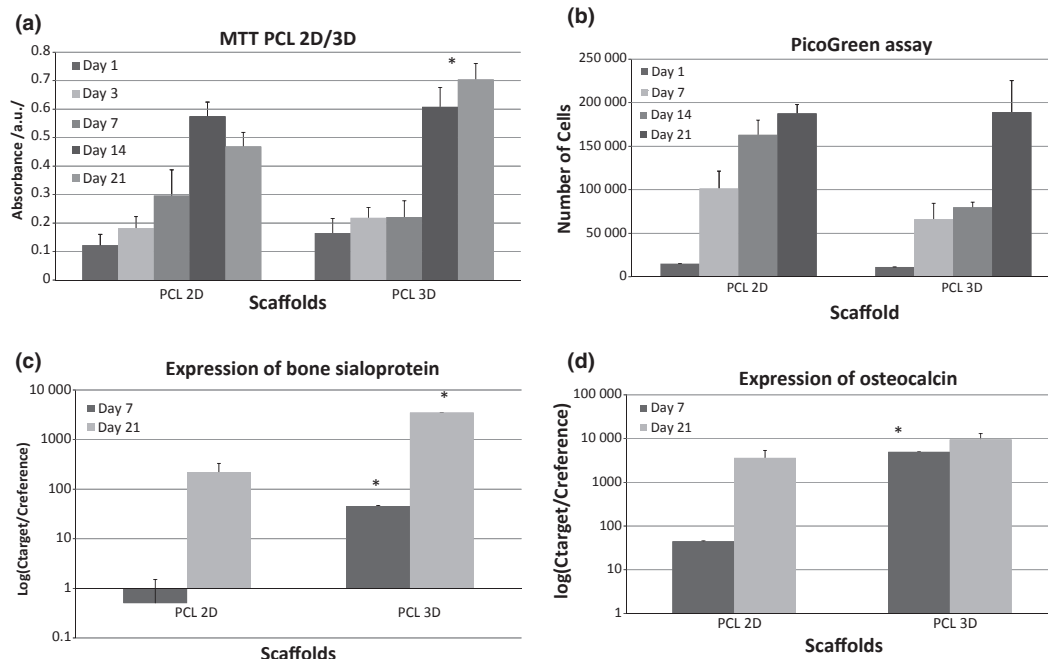


Figure 9. MSCs viability, proliferation, and differentiation. Cell viability was determined using MTT assay (a). PicoGreen assay was used for measuring of MSCs proliferation (b). Osteogenic differentiation was determined by quantification of osteogenic markers, bone sialoprotein and osteocalcin, using real-time PCR (c,d).

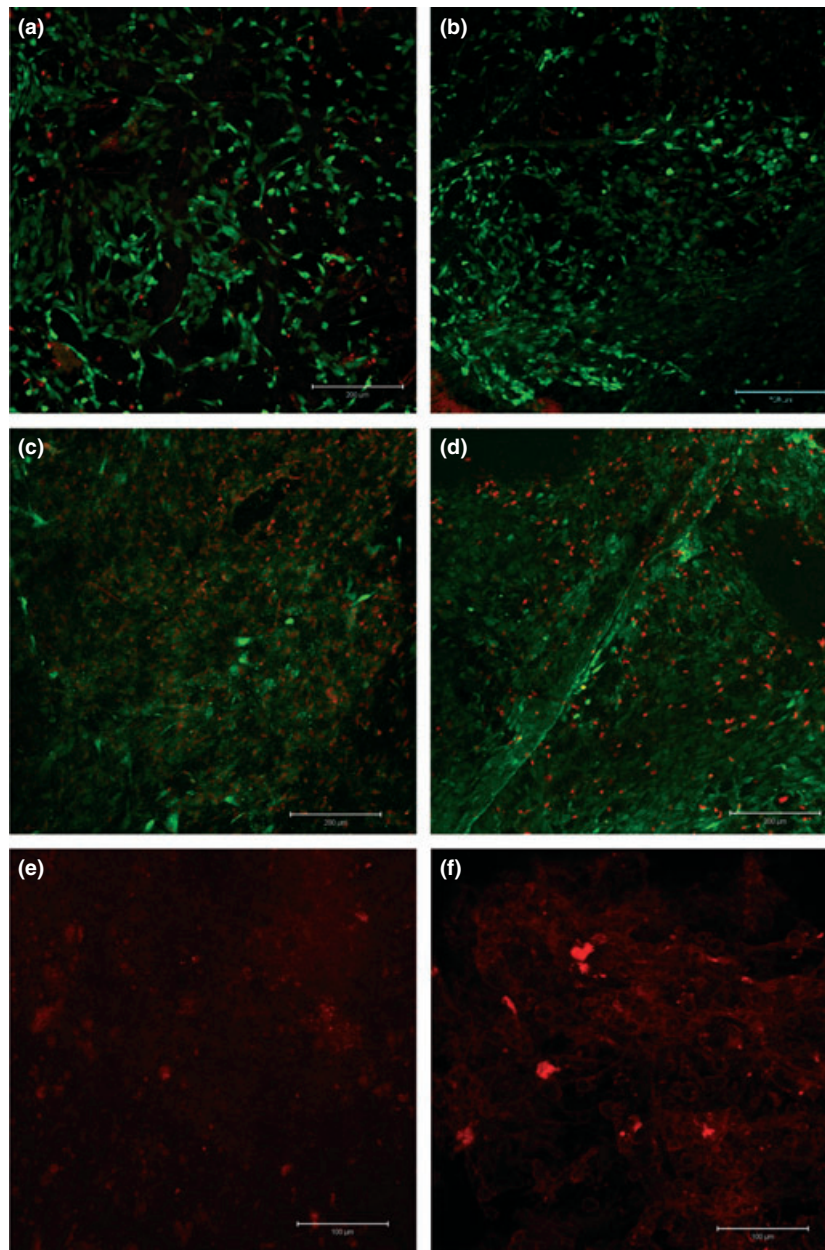


Figure 10. Cell viability and expression of OC visualized by confocal microscopy. Live cells and dead cells on PCL 2D (a and c) and PCL 3D (b and d) scaffolds were stained using BCECF-AM (green colour) and propidium iodide (red colour), respectively, on 7 (a and b) and 21 days (c and d). Immunofluorescence staining of OC on PCL 2D (e) and PCL 3D (f) was assessed on day 21

Data from confocal microscopy supported findings of the MTT assay (Fig. 10). Cell viability was determined as a ratio of live to dead cells, and was significantly higher on 3D PCL scaffolds than on 2D scaffolds on day 7. Viability of cells on 2D scaffolds decreased from 87% on day 14 to 53% on day 21, while on 3D scaffolds, it did not decrease below 86% over the entire experiment (Table 2).

Adherence to 3D PCL nanofibre scaffolds accelerated MSC differentiation

Different types of interactions between MSCs and both 2D and 3D PCL scaffolds, reflected by differences in MSC proliferation, could possibly influence differentiation potential of the cells. Thus, MSCs seeded on each type of scaffold were tested for osteogenic differentia-

Table 2. Cell viability [%]

	d 1	d 7	d 14	d 21
PCL 2D	71 ± 15	85 ± 22	87 ± 7	53 ± 14*
PCL 3D	89 ± 13	86 ± 11	93 ± 4	89 ± 7

Cell viability was measured as the ratio of live to dead cells detected using confocal microscopy (mean ± standard deviation; $P < 0.05$).

tion, determined by real-time PCR analysis and immunofluorescence staining. OC and BS were used as osteogenic markers. Interestingly, expression of both proteins was significantly higher on cells 3D scaffolds than on those of 2D scaffolds, during the entire observation period (Fig. 9c,d). In contrast to cell proliferation, MSC differentiation was significantly elevated 7 days after seeding on 3D meshes, which indicated early cell differentiation compared to those on 2D scaffolds (BS $P < 0.001$; OC $P = 0.003$).

OC expression was also confirmed using immunofluorescence staining. Samples were stained using anti-OC monoclonal antibody and visualized on days 7, 14 and 21. Increasing production of OC was clearly documented over the whole period (Fig. 10).

Discussion

Novel electrospinning setup for laboratory production of 3D nanofibre layers

Simple modification of our electrospinning apparatus – adding a special collector composed of a rotating drum with a metal chain – led to production of knitted-like nanofibrous material with 3D structure arrangement. Results of optical microscopy, SEM, profilometry and X-ray micro-tomography demonstrated that structure of 3D PCL consisted of thin (less dense) areas and elevated (dense) areas. Stereological measurements showed that less dense areas had significantly higher porosity and pore size than had classic planar 2D nanofibres; dense structures were made of tightly packed nanofibres. Composite scaffolds of this kind seem to be very promising for tissue engineering applications.

There are other methods of determining pore size of a mesh, using a variety of special collectors. Zhu *et al.* (35) developed a technique based on a rotating frame cylinder, to prepare parallel mesh fibres. Parallelization of fibres increased pore size between the meshes without altering fibre diameter. A further approach was introduced by Zussman *et al.* (36). This group used a rotating table placed on a rotating disc moving 90° between steps of deposition. The fibrous mesh produced had a 'square mesh' orientation of nanofibres, as any follow-

ing layer had a perpendicular orientation to the one before. Li *et al.* (37–39) developed patterned static collectors consisting of conductive and non-conductive voids; nanofibres were aligned across a non-conductive voids (36). They also developed various collectors enabling production of 3D multi-layered structures with various organizations of fibres (36).

Fibrous 3D scaffolds prepared using special collectors had a clear advantage over methods employing sacrificial (that is, temporary) co-fibres, as here it would not be necessary to remove the pore-forming agents (25). Advantages of our method, as presented in this study, are its simplicity and ability to prepare 3D nanofibres with pores of any desired diameter. This is a key condition for appropriate seeding of each particular cell type.

Surfaces of prepared fibrous 3D PCL meshes were characterized by dense strings (dense areas) elevated over planar fibre layers (thin areas). This phenomenon of non-uniform deposition of fibres could be explained by changes to the electric field due to the collector's structure, as described earlier (above). In our case, the metal chain served as a field concentrator inducing greater fibre deposition and resulting in formation of dense zones. Electric fields around the void gaps between the metal chains was non-homogenous and resulted in less fibre deposition and greater stretching. This arrangement was explained by Li *et al.* (37) as occurring due to changes in Coulombic interactions when fibres approach the vicinity of wires. Coulombic interactions were responsible for fibres' alignment along edges of holes or along metal strips. However, Vaquette *et al.* (25) demonstrated that this theory had limitations, as observed patterns were lost when electrospinning was performed for several hours.

Morphological analysis of our knitted-type mesh revealed the 3D nature of prepared scaffolds. The z-axis height profile of 2D and 3D PCL revealed that while z-axis profile of 2D PCL mesh demonstrated only a slightly rough surface, with fluctuations in the order of 70 µm, the z-axis profile of 3D meshes had much higher peaks, corresponding to a rough surface. Interestingly, both dense and thin areas with less rough surface, were observed in 3D PCL scaffolds with significantly higher average pore sizes in less dense areas. Mean area of pores in less dense areas of scaffolds exceeded 60 µm², approximately 2-fold higher than of 2D PCL. We assume that 60-µm² pores were suitable for cell migration as concluded from previous cell experiments. On the other hand, 30-µm² pores of 2D PCL nanofibres were too small and hindered cell penetration. Thus, 3D scaffolds would be more suitable for cell culture in tissue engineering, where 3D systems are predominantly required.

Results of biomechanical testing showed higher Young's modulus of elasticity and strain/stress resistance of 3D PCL mesh compared to 2D mesh; 3D PCL scaffolds were more elastic and more stress-resistant. Importantly, this is not a consequence of any phase change of the polymers as thermal analysis performed by DSC did not show any difference between the two types of scaffold. Thus, the more favourable biomechanical properties were a consequence of physical scaffold structure and were caused by nano- and micro-stereology of the scaffold. The improved biomechanical properties of PCL 3D mesh were caused by presence of dense areas that reinforced the entire structure. We can easily imagine that elevated structures could be brought down when strain stress is applied, with no damage to side fibres. Consequently, this could provide a simple explanation for higher elasticity of our 3D scaffold. Thus, the proposed scaffold combined advantages of improved cell infiltration in the thin zones and greater mechanical stability in dense parts.

3D PCL nanofibre scaffold improved MSC proliferation and facilitated their differentiation

Properties of the 3D nanofibre PCL scaffold open widespread application of opportunities for it in tissue engineering and regenerative medicine. Cell migration through nanofibre layers is undoubtedly among these attractive features. Our data have clearly proven that the 3D scaffold was characterized by larger pores, and this was obvious, at least for certain locations. Clearly, identical surface mass of 3D samples, characterized with plentiful spikes, must naturally result in larger pore size compared to that of 2D scaffolds with the same surface mass. Larger pores can be expected at ends of spikes, thus facilitating MSC migration through the nanofibre layers. In addition, the 3D scaffold has different structural and stereological features that should result in different local mechanical properties at the nanofibrous spikes. We suppose that these properties alone can influence cell penetration through the layers. On the other hand, larger pores negatively influenced cell seeding efficiency on 3D PCL while small pores of 2D PCL hampered passive penetration of cells and caused their attachment to the surface, resulting in higher seeding efficiency.

Our study has indicated that different structural properties of the 3D nanofibre scaffold also resulted in differences in biocompatibility of MSCs. Biocompatibility of MSCs to PCL nanofibres has been widely reported (40–42). In accordance with the results here, we observed good cell adhesion and proliferation on both 2D and 3D PCL scaffolds. However, MSC adhesion was notably better to 3D samples. We suppose that enhanced MSC adhe-

sion reflects the more extensive surface of 3D scaffolds with more contact sites available for cell adhesion.

The novel 3D scaffold described here was characterized by better proliferation and viability of the cells; probably contact inhibition of cells, which naturally occurs earlier on 2D surfaces than on 3D scaffolds, offers more space for cell proliferation. Interestingly, cell proliferation significantly increased at the later times (day 21), but not in the early stages of this experiment. The explanation of this may be related to cell differentiation. Relationships between proliferation and differentiation of cells has been described in many works (43,44). Coordination of proliferation and differentiation is a fundamental process in normal tissue formation and regeneration. At the cellular level, proliferation and differentiation seem to correspond to independent cell processes that can sometimes be seen separated by a proliferation/differentiation switch (45). Gene and protein expression and activity profiles between proliferation and differentiation significantly differ and the processes are often resolved in time. Due to the multi-factor nature of this coordination process, the exact mechanism of regulation is not completely understood; however, key aspects are associated with signaling networks associated with G₁/G₀ cell cycle arrest and expression of differentiation-associated transcription factors (45,46).

This corresponds to our observation that 3D PCL scaffolds were also characterized by better osteogenic differentiation. This is in good accordance with osteogenic differentiation detected on 3D scaffolds with larger surface areas (47–49). In addition, the relationship between cell spreading and differentiation was reported. It was demonstrated that MSCs that were allowed to adhere, flatten and spread, underwent osteogenesis, whereas unspread, round cells became adipocytes (50).

Thus, we hypothesized that a larger surface available resulted in expression of both OC and BS markers, in our study. However, higher expression of both bone markers was also accompanied by lower cell proliferation between days 7 and 14. In addition, increase in cell proliferation with maintained osteogenic differentiation followed. Meanwhile, MSCs on 2D scaffolds proliferated steadily over the entire 21 day period of the experiment, with reduced cell viability by day 21. Cell differentiation on the 2D scaffold was detected on day 21; this indicated that MSCs differentiated in the earlier stage, which resulted in temporarily slower proliferation.

Consequently, we can conclude that 3D structure of the nanofibre layer can support proliferation and viability of MSCs, and is suitable for application in tissue engineering and regenerative medicine.

Conclusion

A special, novel collector for classic electrospinning has been developed. This collector served as a simple system for production of 3D nanofibres with easily modulated patterns. The 3D PCL scaffold was characterized by more favourable biomechanical properties, particularly greater elasticity and resistance against stress and strain. Such 3D nanofibres can be used for seeding cells of different origin and type, with different requirements for cell lacunae. We prepared 3D PCL nanofibre scaffolds with pore sizes exceeding $60\ \mu\text{m}^2$ and tested them for seeding, proliferation, differentiation and migration of MSCs. We demonstrated that nanofibre layers of 2D scaffolds prevented MSCs from migrating through the scaffold, while these cells infiltrated easily through 3D scaffolds. Adhesion of MSCs to 3D nanofibre PCL layers was also statistically more common than to 2D scaffolds, and proliferation and viability of MSCs 2 or 3 weeks after seeding were greater on 3D PCL scaffolds. In addition, the 3D PCL scaffolds were characterized by better osteogenic differentiation. We suppose that all these positive effects observed on 3D PCL nanofibre scaffolds are related to the larger surface-to-volume ratio of 3D structures. This novel system for producing 3D nanofibre scaffolds with modulated surface patterns can be effectively used in tissue engineering and regenerative medicine.

Acknowledgements

The authors acknowledge Dr. Ivan Krakovsky from Faculty of Mathematics and Physics for calorimetric measurements, and Dr. Jan Remsa from Czech Technical University in Prague for measurements of contact profilometry.

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (institutional research plans AV0Z50390703 and AV0Z50390512), Grant Agency of the Academy of Sciences (grant No. IAA500390702), The Grant Agency of the Charles University (grant No., 96610, 97110, 330611, 384311, 164010, 626011), The Grant Agency of the Czech Republic (grant No. P304/10/1307), Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NT12156) and The Ministry of Education of the Czech Republic - project ERA-NET CARSILA No. ME 10145. The result was developed within the CENTEM project, reg. no. CZ.1.05/2.1.00/03.0088, co-funded by the ERDF as part of the Ministry of Education, Youth and Sports' OP RDI programme and project 'NTIS - New Technologies for Information Society', European Centre of Excellence, CZ.1.05/1.1.00/02.0090.

References

- 1 Langer R, Vacanti J (1993) Tissue engineering. *Science* **260**, 920–926.
- 2 Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC (2007) State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **1**, 245–260. Epub 2007/11/27.
- 3 Karageorgiou V, Kaplan D (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–5491. Epub 2005/04/30.
- 4 Lowery JL, Datta N, Rutledge GC (2010) Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials* **31**, 491–504. Epub 2009/10/14.
- 5 Baker BM, Gee AO, Metter RB, Nathan AS, Marklein RA, Burdick JA *et al.* (2008) The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials* **29**, 2348–2358. Epub 2008/03/04.
- 6 Guimaraes A, Martins A, Pinho ED, Faria S, Reis RL, Neves NM (2010) Solving cell infiltration limitations of electrospun nanofiber meshes for tissue engineering applications. *Nanomedicine (Lond)*. **5**, 539–554. Epub 2010/06/10.
- 7 Nam J, Huang Y, Agarwal S, Lannutti J (2007) Improved cellular infiltration in electrospun fiber via engineered porosity. *Tissue Eng.* **13**, 2249–2257. Epub 2007/06/01.
- 8 Simonet M, Schneider OD, Neuenschwander P, Stark WJ (2007) Ultraporous 3D polymer meshes by low-temperature electrospinning: use of ice crystals as a removable void template. *Polym. Eng. Sci.* **47**, 2020–2026.
- 9 Sundararaghavan HG, Metter RB, Burdick JA (2010) Electrospun fibrous scaffolds with multiscale and photopatterned porosity. *Macromol. Biosci.* **10**, 265–270. Epub 2009/12/17.
- 10 Liao S, Li B, Ma Y, Wei H, Chan C, Ramakrishna S (2006) Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed Mater.* **1**(3), 45–53.
- 11 Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK (2002) Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 613–621. Epub 2002/04/12.
- 12 Liang D, Hsiao BS, Chu B (2007) Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1392–1412.
- 13 Noh HK, Lee SW, Kim JM, Oh JE, Kim KH, Chung CP *et al.* (2006) Electrospinning of chitin nanofibers: degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials* **27**, 3934–3944.
- 14 Park WH, Min BM, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS (2004) Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* **25**, 1289–1297.
- 15 Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD *et al.* (2006) Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials* **27**, 1452–1461.
- 16 Pham QP, Sharma U, Mikos AG (2006) Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* **7**, 2796–2805. Epub 2006/10/10.
- 17 Eichhorn SJ, Sampson WW (2005) Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *J. R. Soc. Interface* **2**, 309–318. Epub 2006/07/20.

- 18 Blakeney BA, Tambralli A, Anderson JM, Andukuri A, Lim DJ, Dean DR *et al.* (2011) Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold. *Biomaterials* **32**, 1583–1590. Epub 2010/11/30.
- 19 Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS (2006) Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials* **27**, 596–606. Epub 2005/07/19.
- 20 Schofer MD, Fuchs-Winkelmann S, Grabedunkel C, Wack C, Dersch R, Rudisile M *et al.* (2008) Influence of poly(L-lactic acid) nanofibers and BMP-2-containing poly(L-lactic acid) nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal* **8**, 1269–1279. Epub 2008/12/30.
- 21 Norris SC, Humpolickova J, Amler E, Huranova M, Buzgo M, Machan R *et al.* (2011) Raster image correlation spectroscopy as a novel tool to study interactions of macromolecules with nanofiber scaffolds. *Acta Biomater.* Vol **7**(12), 4195–4203.
- 22 Yasuda K, Inoue S, Tabata Y (2004) Influence of culture method on the proliferation and osteogenic differentiation of human adipostromal cells in nonwoven fabrics. *Tissue Eng.* **10**, 1587–1596. Epub 2004/12/14.
- 23 Bashur CA, Dahlgren LA, Goldstein AS (2006) Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes. *Biomaterials* **27**, 5681–5688. Epub 2006/08/18.
- 24 Riboldi SA, Sadr N, Pignini L, Neuenschwander P, Simonet M, Mognol P *et al.* (2008) Skeletal myogenesis on highly orientated microfibrillar polyesterurethane scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. **84**, 1094–1101. Epub 2007/08/10.
- 25 Vaquette C, Cooper-White JJ (2011) Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration. *Acta Biomater.* **7**, 2544–2557. Epub 2011/03/05.
- 26 Milleret V, Simona B, Neuenschwander P, Hall H (2011) Tuning electrospinning parameters for production of 3D-fiber-fleeces with increased porosity for soft tissue engineering applications. *Eur Cell Mater.* **21**, 286–303. Epub 2011/03/25.
- 27 Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS (2005) Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* **26**, 5158–5166. Epub 2005/03/29.
- 28 Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ *et al.* (2005) A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **26**, 599–609. Epub 2004/07/30.
- 29 Li WJ, Danielson KG, Alexander PG, Tuan RS (2003) Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. **67**, 1105–1114. Epub 2003/11/19.
- 30 Lim CT, Tan EPS, Ng SY (2008) Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers. *Appl. Phys. Lett.* **92**, 141908 (3 pages).
- 31 Prosecka E, Buzgo M, Rampichova M, Kocourek T, Kochova P, Vyslouzilova L *et al.* (2012) Thin-Layer Hydroxyapatite Deposition on a Nanofiber Surface Stimulates Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Their Differentiation into Osteoblasts. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2012**, 2012: 428503.
- 32 Mickova A, Buzgo M, Benada O, Rampichova M, Fisar Z, Filova E *et al.* (2012) Core/Shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules* **13**, 952–962.
- 33 Tvrdik D, Povysil C, Svatosova J, Dundr P (2005) Molecular diagnosis of synovial sarcoma: RT-PCR detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts in paraffin-embedded tissue. *Med. Sci. Monit.* **11**, Mt1–Mt7.
- 34 Rampichova M, Kostakova E, Filova E, Prosecka E, Plencner M, Ocheretna L *et al.* (2010) Non-woven PGA/PVA fibrous mesh as an appropriate scaffold for chondrocyte proliferation. *Physiol. Res.* **59**, 773–781. Epub 2010/04/22.
- 35 Zhu X, Cui W, Li X, Jin Y (2008) Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering. *Biomacromolecules* **9**, 1795–1801. Epub 2008/06/27.
- 36 Zussman E (2003) Formation of nanofiber crossbars in electrospinning. *Appl. Phys. Lett.* **82**, 973.
- 37 Li D, Wang Y, Xia Y (2003) Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano Lett.* **3**, 1167–1171.
- 38 Li D, Wang Y, Xia Y (2004) Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. *Adv Mater (Weinheim, Ger.)*. **16**, 361–366.
- 39 Li D, Ouyang G, McCann JT, Xia Y (2005) Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes. *Nano Lett.* **5**, 913–916. Epub 2005/05/12.
- 40 Walonen PK, Moutos FT, Kusanagi A, Moretti MG, Diekmann BO, Welter JF *et al.* (2010) *In vitro* generation of mechanically functional cartilage grafts based on adult human stem cells and 3D-woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* **31**, 2193–2200.
- 41 Wise JK, Yarin AL, Megaridis CM, Cho M (2009) Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: engineering the superficial zone of articular cartilage. *Tissue Eng. Part A* **15**, 913–921.
- 42 Mountziaris PM, Tzouanas SN, Mikos AG (2010) Dose effect of tumor necrosis factor-alpha on *in vitro* osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on biodegradable polymeric microfiber scaffolds. *Biomaterials*. **31**, 1666–1675.
- 43 Zhu L, Skoultschi AI (2001) Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 91–97.
- 44 Conlon I, Raff M (1999) Size control in animal development. *Cell* **96**, 235–244.
- 45 Xia K, Xue H, Dong D, Zhu S, Wang J *et al.* (2006) Identification of the proliferation/differentiation switch in the cellular network of multicellular organisms. *PLoS Comput. Biol.* **2**, e145.
- 46 Brown G, Hughes PJ, Michell RH (2003) Cell differentiation and proliferation-simultaneous but independent? *Exper Cell Res.* **291**, 282–288.
- 47 Lode A, Bernhardt A, Gelinsky M (2008) Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med.* **2**, 400–407.
- 48 Fisher JP, Kim K, Dean D, Lu AQ, Mikos AG (2011) Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds. *Acta Biomater.* **7**, 1249–1264.
- 49 Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PH, Lennon DP, Caplan AI *et al.* (2008) Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng. Part A* **14**, 1809–1820.
- 50 McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS (2004) Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–495.

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2013-244

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.03.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **08.10.2014**

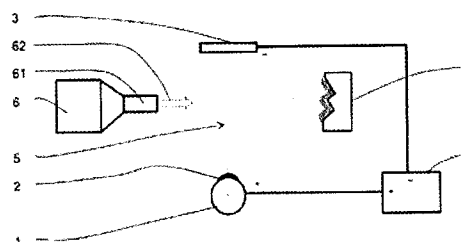
(Věstník č. 41/2014)

B82B 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61L 15/64 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
D01D 5/18 (2006.01)
D04H 1/70 (2012.01)

(71) Přihlašovatel:
Technická univerzita v Liberci, Liberec, CZ

(72) Původce:
Ing. Jiří Chvojka, Liberec, CZ
Ing. Petr Mikeš, Ph.D., Mníšek u Liberce, CZ
Filip Sanetrník, Liberec, CZ
Bc. Jakub Erben, Vrchlabí, CZ
prof. David Lukáš, Ph.D., Liberec, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, Cejl 38, 602 00 Brno



(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy
polymerních nanovláken a způsob
pokrývání prostorově tvarovaného povrchu
tělesa prostorově tvarovanou vrstvou
polymerních nanovláken**

(57) Anotace:

Vynález se týká způsobu výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken (5), u kterého se ve zvláknovacím prostoru vytváří polymerní nanovláčka (5), která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají, přičemž se vychýlí laminárním proudem (62) vzduchu nebo plynu směrem k předloze (7) s prostorově tvarovaným povrchem, a stejným nebo jiným laminárním proudem (62) vzduchu nebo plynu se přitisknou k tomuto jejímu povrchu, v důsledku čehož se na ně ukládají do prostorově tvarované vrstvy, která kopíruje tvar prostorově tvarovaného povrchu předlohy (7). Vynález se týká také způsobu pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken (5), u kterého se ve zvláknovacím prostoru vytváří polymerní nanovláčka (5), která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají.

Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken a způsob pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken, u kterého se ve zvlákňovacím prostoru vytváří polymerní nanovlákná, která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají.

Vynález se týká také způsobu pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken, u kterého se ve zvlákňovacím prostoru vytváří polymerní nanovlákná, která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají.

15 Dosavadní stav techniky

Typickým produktem všech dosud známých postupů pro výrobu polymerních nanovláken elektrostatickým zvlákňováním roztoků nebo tavenin polymerů využívajících statické jehlové zvlákňovací elektrody (trysky, kapiláry, apod.) nebo pohyblivé hladinové zvlákňovací elektrody (rotující válec, ve směru své délky se pohybující struna, rotující spirála, apod.) je plošná vrstva náhodně uložených a propletených polymerních nanovláken. Ta má sice v kombinaci s dalšími podpůrnými či krycími vrstvami celou řadu využití, zejména v oblasti filtrace a hygienických prostředků, avšak pro mnoho dalších aplikací, jako např. tkáňové-inženýrství, regenerativní medicína, výroba umělých orgánů, apod. je využitelná pouze omezeně. Tyto aplikace totiž principiálně vyžadují spíše prostorové útvary nebo prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken, které se svým tvarem přibližují např. tvaru lidského orgánu nebo jeho části/částí, nebo jiného vhodného tělesa určeného pro medicínské nebo technické aplikace.

V současné době však není známý způsob výroby takových prostorově tvarovaných vrstev polymerních nanovláken, ani způsob pokrývání prostorově

5 tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken. Při ukládání polymerních nanovláken na prostorově tvarovaný povrch tělesa během jejich výroby, totiž dochází ke koncentraci elektrického náboje na výstupcích tohoto povrchu, takže polymerní nanovlákná se ukládají přednostně na těchto výstupcích a pouze přemostňují prostory mezi nimi. Ve výsledku tak vzniká pouze více či méně nerovnoměrná plošná vrstva polymerních nanovláken vytvářející konvexní obálku prostorově tvarovaného povrchu tělesa, bez pokrytí jeho snížených částí.

10 Cílem vynálezu je navrhnout způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken, resp. způsob pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa vrstvou polymerních nanovláken, která by co nejpřesněji kopírovala tvar jeho povrchu.

Podstata vynálezu

15 Cíle vynálezu se dosáhne způsobem výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken, u kterého se ve zvlákňovacím prostoru vytváří polymerní nanovlákná, která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají. Podstata tohoto způsobu přitom spočívá v tom, že polymerní nanovlákná se vychýlí laminárním proudem
20 vzduchu nebo plynu směrem k předloze s prostorově tvarovaným povrchem, a stejným nebo jiným laminárním proudem vzduchu nebo plynu se přitisknou k tomuto jejímu povrchu, v důsledku čehož se na něm ukládají do prostorově tvarované vrstvy, která kopíruje tvar prostorově tvarovaného povrchu předlohy.

25 V případě potřeby se přitom rychlost a/nebo směr pohybu polymerních nanovláken alespoň jednou koriguje alespoň jedním dalším laminárním proudem vzduchu.

30 Pro dosažení požadovaného rozložení polymerních nanovláken na povrchu předlohy, a tím i požadované struktury vytvořené prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken, nebo pro zachycení polymerních nanovláken v úplavu v okolí předlohy nebo za ní, se předloha během ukládání polymerních nanovláken pohybuje přímočarým a/nebo vratným a/nebo přerušovaným

pohybem v horizontálním a/nebo vertikálním směru a/nebo rotačním a/nebo kyvným pohybem kolem libovolné osy.

Cíle vynálezu se dosáhne také způsobem pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken, u kterého se ve zvlákňovacím prostoru vytváří polymerní nanovlákná, která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají. Jeho podstata přitom spočívá v tom, že polymerní nanovlákná se vychýlí laminárním proudem vzduchu nebo plynu směrem k předloze s prostorově tvarovaným povrchem, a stejným nebo jiným laminárním proudem vzduchu nebo plynu se přitisknou k tomuto jejímu povrchu. V důsledku toho se na něm ukládají do prostorově tvarované vrstvy, která kopíruje tvar prostorově tvarovaného povrchu předlohy. V případě potřeby se přitom rychlost a/nebo směr jejich pohybu alespoň jednou koriguje alespoň jedním dalším laminárním proudem vzduchu.

Pro dosažení požadovaného rozložení polymerních nanovláken na povrchu předlohy, a tím i požadované struktury vytvořené prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken, nebo pro zachycení polymerních nanovláken v úplavu v okolí předlohy nebo za ní, se předloha během ukládání polymerních nanovláken pohybuje přímočarým a/nebo vratným a/nebo přerušovaným pohybem v horizontálním a/nebo vertikálním směru a/nebo rotačním a/nebo kyvným pohybem kolem libovolné osy.

V dalších variantách lze polymerní nanovlákná zachycená úplavem v okolí předlohy přitisknout k libovolné části jejího povrchu proudem vzduchu, mechanickým zařízením a/nebo pohybem předlohy, nebo je z předlohy úplně odstranit.

Objasnění výkresů

Na obr. 1 je schematicky znázorněna jedna z variant zařízení k provádění způsobu výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken, resp. k provádění způsobu pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken, a princip tohoto způsobu.

Příklady uskutečnění vynálezu

Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken a způsob pokrývání povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken podle vynálezu využívá známý způsob výroby polymerních nanovláken elektrostatickým zvlákňováním. U tohoto způsob se polymerní nanovláknena vytváří z roztoku nebo taveniny polymeru, který se přivede nebo průběžně přivádí nebo se transportuje do elektrostatického pole vytvořeného rozdílem elektrických potenciálů mezi alespoň jednou zvlákňovací elektrodou a alespoň jednou sběrnou elektrodou. Zvlákňovací elektroda a sběrná elektroda jsou současně propojeny s opačnými póly zdroje vysokého stejnosměrného napětí, se stejnými póly zdroje vysokého stejnosměrného napětí s odlišnou hodnotou napětí, nebo je jedna z nich uzemněna. Kromě toho je možné v dalších variantách využít také postup elektrického zvlákňování popsany v CZ PV 2012-907, u kterého se na zvlákňovací elektrodu přivádí střídavé napětí. Jako zvlákňovací elektrodu a sběrnou elektrodu je ve všech variantách možné použít libovolný známý typ, resp. tvar těchto elektrod. Jako zvlákňovací elektrodu je tak možné použít zejména statickou zvlákňovací elektrodu tvořenou tryskou, jehlou, tyčí, kovovým hrotem, lištou, strunou (viz např. EP 2173930), apod. nebo jejich skupinou, nebo pohyblivou hladinovou zvlákňovací elektrodu tvořenou otáčejícím se protáhlým tělesem, např. válcem (viz např. EP 1673493 nebo EP 2059630), spirálou, diskem, či jiným otáčejícím se tělesem, nebo ve směru své délky se průběžně nebo přerušovaně pohybující strunou (viz např. EP 2173930), atd. Jako sběrnou elektrodu pak lze použít např. kovovou desku, strunu/soustavu strun, tyč/soustavu tyčí, mřížku, válec (viz např. WO 2008011840), hrot/soustavu hrotů (viz např. WO 2009049564), apod. V dalších variantách lze pro výrobu polymerních nanovláken použít i jiné známé způsoby, vč. tzv. „forcespinningu“ – tj. způsobu výroby polymerních nanovláken založeného na působení odstředivé síly.

Podstata vynálezu bude dále vysvětlena na funkci zařízení pro výrobu polymerních nanovláken elektrostatickým zvlákňováním schematicky znázorněného na obr. 1. Toto zařízení obsahuje alespoň jednu zvlákňovací elektrodu 1 ve tvaru válce, na jejímž povrchu se nachází nebo vynáší roztok 2 nebo tavenina polymeru, který má být zvlákněn, a proti ní umístěnou alespoň

- jednu sběrnou elektrodu 3 tvořenou kovovou deskou. Zvlákňovací elektroda 1 a sběrná elektroda 3 jsou propojeny s opačnými póly zdroje 4 vysokého stejnosměrného napětí, přičemž zvlákňovací elektroda 1 je s výhodou propojena s jeho kladným pólem a sběrná elektroda 3 s jeho záporným pólem.
- 5 V důsledku rozdílu elektrického potenciálu se pak mezi těmito elektrodami 1 a 3 vytváří elektrostatické pole o vysoké intenzitě, které silovým působením na roztok 2 nebo taveninu polymeru na povrchu zvlákňovací elektrody 1 z něj/ní v daném zvlákňovacím prostoru formuje a dlouží jednotlivá polymerní nanovlákná 5, která poté unáší směrem ke sběrné elektrodě 3.
- 10 Do prostoru mezi zvlákňovací elektrodou 1 a sběrnou elektrodou 3 je vyústěna vzduchová (plynová) tryska 6 opatřená přetlakovou vyústkou 61, tvořenou jedním nebo několika rovnoběžnými kanály čtvercového nebo obdélníkového příčného průřezu, které vytváří laminární proud 62 vzduchu, nebo vůči polymerním nanovláknům 5 inertního plynu. Tato přetlaková vyústka
- 15 61 je přitom s výhodou opatřena neznázorněným regulátorem rychlosti proudění. Ve znázorněném příkladu provedení je přetlaková vyústka 61 nasměrována do prostoru mezi zvlákňovací elektrodou 1 a sběrnou elektrodou 3 horizontálně z boku, kolmo nebo v podstatě kolmo vůči pohybu polymerních nanovláken 5 v tomto zvlákňovacím prostoru. V jiných neznázorněných
- 20 variantách však může být do tohoto prostoru nasměrována dle potřeby a prostorového uspořádání dalších prvků libovolně jinak, resp. pod libovolným úhlem, případně může být do tohoto prostoru nasměrováno několik přetlakových vyústek 61 propojených s jednou nebo několika vzduchovými (plynovými) tryskami 6.
- 25 Proti přetlakové vyústce 61 je na opačné straně mimo zvlákňovací prostor mezi zvlákňovací elektrodou 1 a sběrnou elektrodou 3 uložena předloha 7, podle jejíhož členitého povrchu se má vytvářená vrstva polymerních nanovláken 5 prostorově tvarovat, nebo který má alespoň částečně pokrývat. Tato předloha 7, která může být vytvořena z libovolného elektricky vodivého
- 30 nebo nevodivého materiálu, je přitom uložena staticky, nebo v případě potřeby libovolně pohyblivě v horizontálním a/nebo vertikálním směru a/nebo otočně a/nebo kavně okolo libovolné osy.

Při provozu zařízení znázorněného na obr. 1 se mezi zvlákňovací elektrodou 1 a sběrnou elektrodou 3 vytváří elektrické pole o vysoké intenzitě, které svým silovým působením vytváří na povrchu roztoku 2 nebo taveniny polymeru na povrchu zvlákňovací elektrody 1 tzv. Taylorovy kužely, ze kterých
5 dlouhí jednotlivá polymerní nanovlákná 5, která poté unášejí směrem ke sběrné elektrodě 3. Přitom jsou tato polymerní nanovlákná 5 dynamickým účinkem laminárního proudu 62 vzduchu (plynu) z přetlakové vyústky 61 vychylována ze svého původního směru k předloze 7, a po kontaktu s ní jsou jím přitlačována k jejímu členitému povrchu. V důsledku toho se tato polymerní nanovlákná 5
10 ukládají rovnoměrně po celém náletovém povrchu předlohy 7 do prostorově tvarované vrstvy, která věrně kopíruje tvar povrchu předlohy 7 a udržuje si tento svůj tvar i po sejmutí z ní. Při obtékání předlohy 7 proudem vzduchu (plynu) nesoucím polymerní nanovlákná 5, se ve směru pohybu tohoto proudu za předlohou 7 navíc vytváří úplav, přičemž část polymerních nanovláken 5, která
15 se nezachytila na náletové straně předlohy 7, kopíruje proudnice tohoto úplavu. Přitom se uspořádávají do stejného směru (paralelizují se). Tato část vrstvy polymerních nanovláken 5 se pak může dle potřeby odstranit a využít samostatně, nebo se může mechanicky (např. jiným proudem vzduchu a/nebo pohybem předlohy 7 a/nebo k tomu určeným neznázorněným zařízením, apod.)
20 přitisknout k libovolné části povrchu předlohy 7. Chování proudu vzduchu v úplavu přitom lze požadovaným způsobem ovlivnit vhodným tvarováním předlohy 7, kterou úplav obtéká.

Předloha 7 se přitom může pro dosažení předem daného rozložení polymerních nanovláken 5 na předem dané části jejího povrchu alespoň
25 v některých okamžicích pohybovat rotačním, kyvným, přímočarým nebo kombinovaným či přerušovaným nebo vratným pohybem, a to buď v horizontálním a/nebo vertikálním směru.

Dle požadavků se způsobem podle vynálezu vytvoří vrstva polymerních nanovláken 5 s prostorovým tvarem odpovídajícím prostorovému tvaru povrchu
30 předlohy 7, nebo skořepina z polymerních nanovláken 5 pokrývající celý povrch předlohy 7 nebo jeho požadovanou část.

Příklad 1

Způsob podle vynálezu byl testován při zvlákňování roztoku obsahujícího 18 % hmotnostních polykaprolaktonu (PCL) o molekulové hmotnosti MW 45000 v rozpouštědlovém systému chloroform-etanol (9:1).

- 5 Elektrostatické zvlákňování probíhalo za použití zvlákňovací elektrody 1 dle EP 2059630, která se otáčela okolo své podélné osy rychlostí 22 ot./min a statické sběrné elektrody 2 tvořené kovovou deskou o rozměrech 100x100 mm. Na zvlákňovací elektrodu 1 se přitom přivádělo napětí +16,2 kV, na sběrnou elektrodu 2 tvořenou kovovou deskou napětí -26 kV. Elektrody 1 a 2 byly od sebe vzdáleny 150 mm, přičemž přibližně v polovině této vzdálenosti se do
- 10 prostoru mezi nimi přetlakovou vyústkou 61 přiváděl laminární proud 62 vzduchu, který měl nad zvlákňovací elektrodou 1 rychlost cca 11 m/min, a který usměrňoval vytvářená polymerní nanovlákná 5 k předloze 7 uložené ve vzdálenosti 300 mm od zvlákňovací elektrody 1. Tímto způsobem se na
- 15 předloze 7 vytvořila prostorově tvarovaná vrstva polymerních nanovláken 5 polykaprolaktonu o plošné hmotnosti 1,99 g/m².

- Během testu se současně měřila rychlost laminárního proudu 62 vzduchu v různých vzdálenostech od ústí přetlakové vyústky 61 – viz tabulka 1, přičemž se zjistilo, že tento proud si zachoval laminární charakter do
- 20 vzdálenosti 300 mm za zvlákňovací elektrodou 1.

Tabulka 1

Vzdálenost za zvlákňovací elektrodou [mm]	100	150	200	250	300
Rychlost [m/s]	10,1	9,2	8,3	7,2	6

- V neznázorněných variantách provedení může být do prostoru mezi
- 25 zvlákňovací elektrodou 1 a sběrnou elektrodou 3 nasměrována alespoň jedna další přetlaková vyústka 61 propojená se stejnou nebo jinou vzduchovou (plynovou) tryskou 6, přičemž laminární proud 62 vzduchu z ní slouží k alespoň

jedné korekci rychlosti a/nebo směru pohybu polymerních nanovláken 5 směrem k předloze 7 a/nebo k zachování laminárního charakteru proudu vzduchu nesoucího polymerní nanovláčka 5 a/nebo k přitlačení polymerních nanovláken 5 k prostorově tvarovanému povrchu předlohy 7.

- 5 V dalších neznázorněných variantách provedení lze dosáhnout laminárního charakteru proudu/proudů 62 vzduchu (plynu) jiným vhodným způsobem, než použitím přetlakové výústky 61.

 Způsobem podle vynálezu připravená prostorově tvarovaná vrstva polymerních nanovláken 5 nebo skořepina tvořená vrstvou polymerních
10 nanovláken 5, resp. prostorově tvarované těleso s uloženou prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken 5, může být využita zejména jako substrát, resp. nosič pro kultivaci živých buněk. Její tvar se přitom může s použitím vhodné předlohy přizpůsobit v podstatě libovolným požadavkům, a může simulovat např. tvar lidského nebo zvířecího orgánu nebo jeho části, jako
15 např. srdeční chlopně, cévní přepážky, tělesa cévy, povázku a podobně, a po osazení vhodnými buňkami sloužit pro umělou přípravu těchto částí lidského nebo zvířecího těla. Kromě toho lze prostorově tvarovanou vrstvu polymerních nanovláken 5 použít například také v oblasti filtrace a filtrační techniky pro speciální filtry, nebo jako izolační vrstvu v elektrotechnice, jako povlak elektrod,
20 sond a jiných funkčních trojrozměrných předmětů, jako speciální tvarované separační nebo polopropustné vrstvy, atd. Dle předpokládané aplikace lze volit druh použitého polymeru, jeho vlastnosti, případně do něj doplněné přísady, a zejména pak lze měnit tvar prostorově tvarované vrstvy/skořepiny.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken (5), u kterého se ve zvlákňovacím prostoru vytváří polymerní nanovlákná (5), která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají, **vyznačující se tím, že** polymerní nanovlákná (5) se vychýlí laminárním proudem (62) vzduchu nebo plynu směrem k předloze (7) s prostorově tvarovaným povrchem, a stejným nebo jiným laminárním proudem (62) vzduchu nebo plynu se přitisknou k tomuto jejímu povrchu, v důsledku čehož se na něm ukládají do prostorově tvarované vrstvy, která kopíruje tvar prostorově tvarovaného povrchu předlohy (7),

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** rychlost a/nebo směr pohybu polymerních nanovláken (5) se před uložením na povrch předlohy (7) alespoň jednou koriguje alespoň jedním dalším laminárním proudem (62) vzduchu.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** předloha (7) se během ukládání polymerních nanovláken (5) pohybuje přímočarým a/nebo vratným pohybem v horizontálním a/nebo vertikálním směru a/nebo rotačním a/nebo kyvným pohybem kolem libovolné osy.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím, že** pohyb předlohy (7) se během ukládání polymerních nanovláken (5) alespoň jednou přeruší.

5. Způsob pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken (5), u kterého se ve zvlákňovacím prostoru vytváří polymerní nanovlákná (5), která se při svém pohybu vychýlí proudem vzduchu nebo plynu směrem k podkladu, na který se ukládají, **vyznačující se tím, že** polymerní nanovlákná (5) se vychýlí laminárním proudem (62) vzduchu nebo plynu směrem k předloze (7) s prostorově tvarovaným povrchem, a stejným nebo jiným laminárním proudem (62) vzduchu nebo plynu se přitisknou k tomuto jejímu povrchu, v důsledku čehož se na něm

ukládají do prostorově tvarované vrstvy, která kopíruje tvar prostorově tvarovaného povrchu předlohy (7).

6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím, že** rychlost a/nebo směr pohybu polymerních nanovláken (5) se před uložením na povrch předlohy (7) alespoň jednou koriguje alespoň jedním dalším laminárním proudem (62) vzduchu.

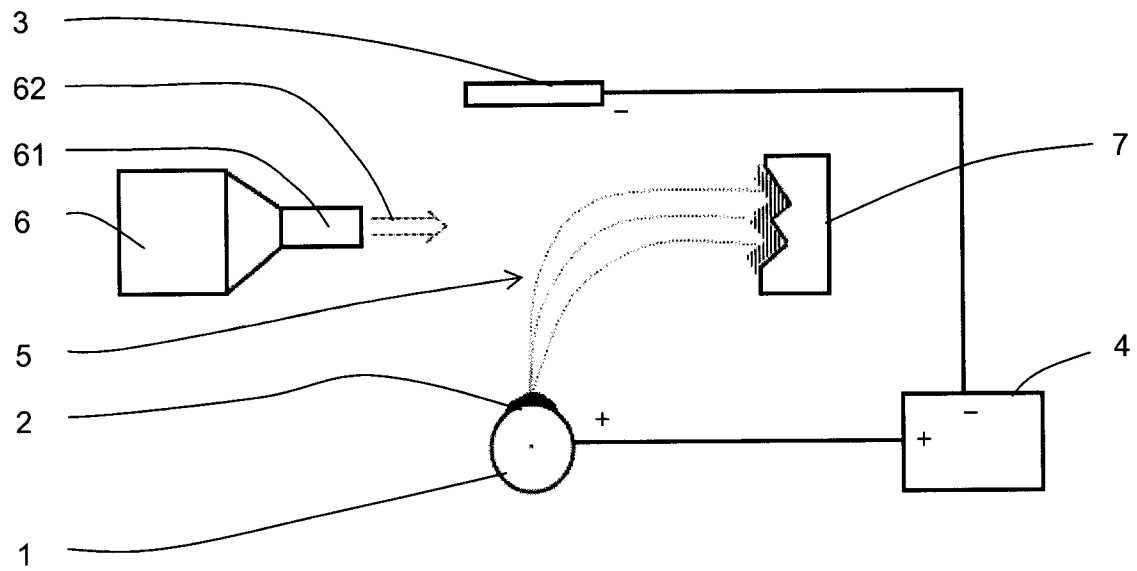
7. Způsob podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím, že** předloha (7) se během ukládání polymerních nanovláken (5) pohybuje přímočarým a/nebo vratným pohybem v horizontálním a/nebo vertikálním směru a/nebo rotačním a/nebo kyvným pohybem kolem libovolné osy.

8. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím, že** pohyb předlohy (7) se během ukládání polymerních nanovláken (5) alespoň jednou přeruší.

9. Způsob podle libovolného z nároků 5 až 8, **vyznačující se tím, že** polymerní nanovláčka (5) zachycená úplavem v okolí předlohy (7) se proudem vzduchu, mechanickým zařízením a/nebo pohybem předlohy (7) přitisknou k libovolné části jejího povrchu (7), nebo se z ní odstraní.

20.03.13

1/1



Obr. 1

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2014-330

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A61F 2/28 (2006.01)

A61F 2/30 (2006.01)

A61L 27/40 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.05.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **25.11.2015**
(Věstník č. 47/2015)

(71) Přihlašovatel:
Technická univerzita v Liberci, Liberec 1, CZ

(72) Původce:
Ing. Jiří Chvojka, Ph.D., Liberec, CZ
Ing. Bc. Eva Košťáková, Ph.D., Turnov, CZ
prof. David Lukaš, CSc., Liberec, CZ
Ing. Jiří Šafka, Ph.D., Ostroměň, CZ
Kristián Kříž, Liberec, CZ

(74) Zástupce:
RETROPATENT s.r.o., Mgr. Kamil Kolátor, Dolní
náměstí 679/5, 466 01 Jablonec nad Nisou

(54) Název přihlášky vynálezu:
**3D kompozitní materiál určený především
jako biodegradabilní náhrada chrupavky**

(57) Anotace:
Materiál pro náhradu kloubní chrupavky na bázi
nanovláken s různou plošnou hmotností a vzorováním
v ploše vrstvy, čímž materiál získává místa s větší a
s menší porozitou. Nanovláknový materiál je propojen
vrstvami vytvořenými pomocí metody 3D tisku a tím je
vytvořen kompozitní materiál.

CZ 2014 - 330 A3

3D kompozitní materiál určený především jako biodegradabilní náhrada chrupavky

Oblast techniky:

Vynález se týká složení strukturované nanovláknenné vrstvy s kombinací metody 3D tisku k vytvoření biodegradabilního materiálu pro použití jako náhrada kolenní chrupavky.

Dosavadní stav techniky:

V současné době se jako náhrady chrupavek používají materiály ve formě vláken, nebo pěn. Nevýhodou těchto materiálů je nedostatečná buněčná proliferace do vnitřku těchto materiálů a tedy nedostatečné vytvoření nové chrupavky v celém objemu scaffoldu.

Podstata vynálezu:

Cílem vynálezu je nalézt vhodný materiál na bázi nanovláken s různou plošnou hmotností a vzorováním v ploše vrstvy, čímž materiál získává místa s větší a s menší porozitou. Nanovláknenný materiál je propojen vrstvami vytvořenými pomocí metody 3D tisku a tím je vytvořen kompozitní materiál. Takto vytvořený kompozit bude optimálně sloužit jako vhodný tkáňový nosič pro vytvoření kolenní chrupavky.

Cíle technického řešení podle tohoto vynálezu je dosaženo kombinací metody 3D tisku, tedy rapid prototyping, a elektrostatického zvlákňování. Materiál využitý pro 3D tisk je biokompatibilní a biodegradabilní polymer poly-ε-kaprolakton vytlačovaný ve formě mikronových vláken do pravidelných struktur např. pravidelné mříže z na sebe kolmo kladených vláken. Takto vytvořený materiál je ukládán na strukturovanou nanovláknennou vrstvu. Nanovláknenná vrstva je strukturovaná z důvodu rozdílné plošné hmotnosti v ploše a má tedy různé velikosti pórů ve struktuře. Vytvořený materiál slouží jako biodegradabilní náhrada v tkáňovém inženýrství hyalinní chrupavky.

Nanovláknenná vrstva je ve formě strukturované vrstvy, kde se mění plošná hmotnost jednotlivých částí této vrstvy. Důvodem je různá velikost pórů a tedy snadnější prostup buněčné kultury přes místa s nižší plošnou hmotností a větší velikostí pórů. Vytvořená nanovláknenná vrstva je z biodegradabilního a biokompatibilního materiálu poly-ε-kaprolakton o molekulové hmotnosti 45.000, 14.000 nebo jejich kombinace nebo další molekulové hmotnosti.

Při metodě 3D tisku je použito technologie tavení polymeru a následné vytlačení přes definovanou trysku. Průměr vytlačovací trysky zajistí přesně definovaný průměr vláken.

Vlákna jsou ukládána do struktur předdefinovaných v grafickém programu. Jako polymerní materiál je použit biodegradabilní a biokompatibilní polymer poly-ε-kaprolakton o molekulové hmotnosti 45.000, 14.000 nebo jejich kombinace nebo další molekulové hmotnosti.

Výhodou tohoto vlákenného kompozitního materiálu je snadnost kombinace jednotlivých technologií a jednoduchost jeho výroby. Připravený materiál je vhodný pro laboratorní i průmyslové procesy výroby, bez nutnosti úpravy stávajících procesů.

Přehled obrázků na výkresech:

Technické řešení podle tohoto vynálezu bude blíže objasněno pomocí výkresů, kde na obr. 1 je znázorněna struktura 3D kompozitního materiálu podle užitého vzoru a na obr. 2 je znázorněn řez 3D kompozitním materiálem znázorňující vrstvení materiálů vyrobených pomocí 3D tisku a nanovláknenného vzorovaného materiálu vyrobeného pomocí elektrostatického zvlákňování.

Příklad provedení vynálezu:

Nanovláknenný strukturovaný materiál 1 mřížové struktury s charakteristickým průměrem vláken 200-400 nm, je povrstven vrstvou 2 pomocí metody 3D tisku přičemž takto vytvořená struktura má charakteristický rozměr 20-200μm. Kompozitní materiál 1 je mechanicky vrstven tak, aby došlo k pravidelnému opakování s vrstvou 2 tvořenou 3D tiskem a k vytvoření sendvičové struktury. Vrstvení probíhá buď přímo při výrobě – nanášením jednotlivých vrstev postupně na sebe anebo pomocí předvýroby jednotlivých vrstev a následného pojení biodegradabilními pojivy na bázi vodných roztoků tkáňových pojiv, biodegradabilních polymerů jako například polyetylenoxidu, chitosanu, želatiny atd.

Průmyslová využitelnost:

Technické řešení podle tohoto vynálezu je využitelné jako vhodný tkáňový nosič pro vytvoření chrupavky, tedy především v medicíně.

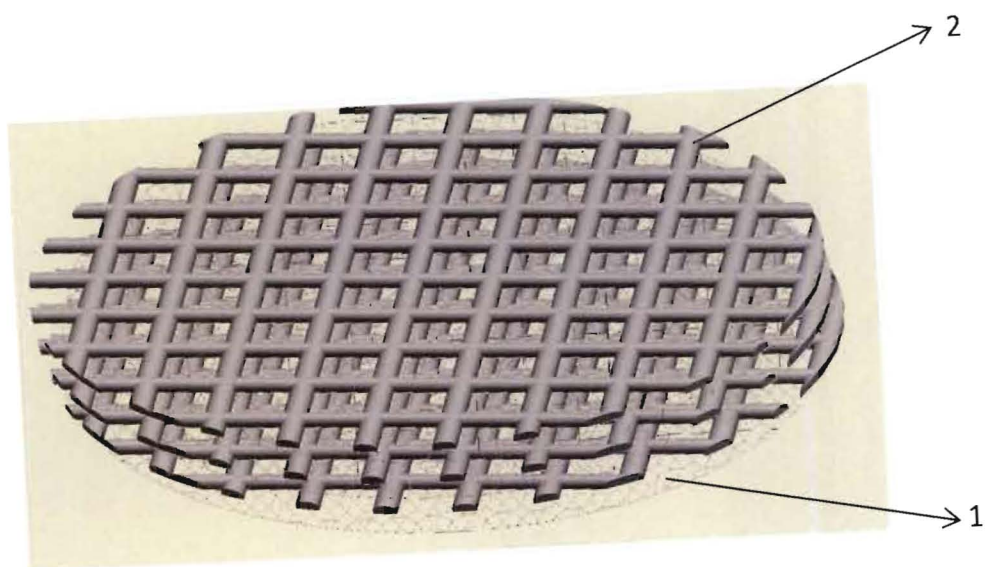
PATENTOVÉ NÁROKY

1. 3D kompozitní materiál určený především jako biodegradabilní náhrada chrupavky, **vyznačující se tím, že** nejméně jedna vrstva materiálu na bázi nanovláken (1) s různou plošnou hmotností a vzorováním v ploše vrstvy je propojena s nejméně jednou vrstvou (2) vytvořenou pomocí metody 3D tisku a tím je vytvořen kompozitní materiál.
2. 3D kompozitní materiál určený především jako biodegradabilní náhrada chrupavky podle bodu 1, **vyznačující se tím, že** vrstva na bázi nanovláken (1) je strukturovaná z důvodu rozdílné plošné hmotnosti v ploše a má tedy různé velikosti pórů ve struktuře.
3. 3D kompozitní materiál určený především jako biodegradabilní náhrada chrupavky podle bodu 1, **vyznačující se tím, že** vrstva na bázi nanovláken (1) je mechanicky vrstvena tak, aby došlo k pravidelnému opakování s vrstvou 2 tvořenou 3D tiskem a k vytvoření sendvičové struktury.

13.05.14

1/2 3

2015-2020

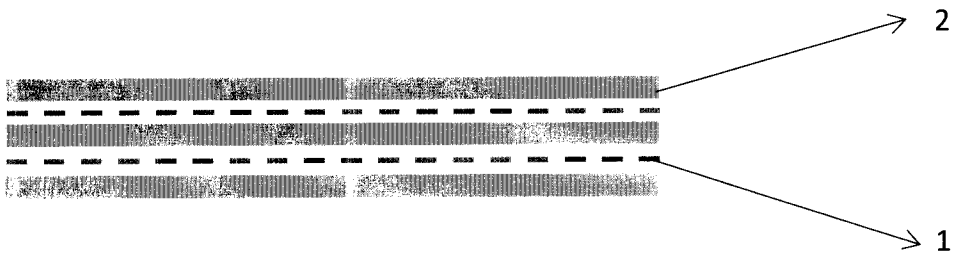


Obr. 1

13.05.14

2/2

2015-330



Obr. 2

Příloha č. 2

Chvojka, Jiri; Hinestroza, J. P.; Lukas, David: Production of Poly(vinylalcohol) Nanoyarns Using a Special Saw-like Collector, FIBRES & TEXTILES IN EASTERN EUROPE Volume: 21 Issue: 2, Pages: 28-31 Published: MAR-APR 2013 (IF 0,626)

Patent: Způsob výroby polymerních nanovláken zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli a lineární útvar z polymerních nanovláken vytvořený tímto způsobem.

Jiri Chvojka^{1,2},
J. P. Hinestroza³,
David Lukas^{1,2}

¹Centre for Nanomaterials,
Advanced Technologies and Innovation,
Technical University of Liberec
Studentská 2, Liberec 1, 46116, Czech Republic.
E-mail: jiri.chvojka@tul.cz

²NanoScience Centre,
Faculty of Textile Engineering,
Technical University of Liberec,
Studentská 2, Liberec 1, 46116, Czech Republic.

³Fiber Science Program,
College of Human Ecology,
Cornell University,
242 Van Rensselaer Hall, Ithaca, New York, U.S.

Production of Poly(vinylalcohol) Nanoyarns Using a Special Saw-like Collector

Abstract

This work introduces an electrospinning method for laboratory-scale production of nanofibrous materials from polyvinylalcohol (PVA) nanofibres. A procedure for the subsequent production of twisted yarns from the aligned nanofibrous strand is introduced as well. Both needle and needleless electrospinning variants were employed. Mechanical properties of the nanoyarns produced were tested using a VIBRODYN 400 and their morphology was investigated by light and electron microscopy. The work also introduces a simple analysis of the field strength that causes the prevailing unidirectional fiber deposition between neighbouring lamellae of a special saw-like collector. The field strength analysis was carried out both analytically and by modelling based on the software COMSOL Multiphysics.

Key words: needle-less electrospinning, aligned nanofibers, nanoyarns.

■ Introduction

The leading technology for the massive production of nanofibres is electrospinning, a process that forms nanofibres from polymer solution or polymer melts using electrical field gradients. It is expected that nanofibre yarns, similar to nanofibre layers, will find applications in high value-added fields such as composites, filtration media, gas separation, sensors, biomedical engineering, etc. In recent years, researchers have explored novel mechanical and electrostatic mechanisms to better control the electrospinning process. The effort is, among others, focused on collecting ordered yarns aiming at further improvements in yarn morphology, mechanical properties, linear density and fibre orientation/twist. Nanoyarn producing technologies can be divided into the following groups.

The first trial to make nanofibrous continuous yarns used a rotating disc electrode and was done by Formhals *et al.* [1 - 3]. Next attempts to employ various kinds of rotating collectors were made by Huang [4], who collected fibre bundles onto the sharp edge of a thin rotating wheel using an auxiliary electrode. Zussman *et al.* applied a wheel-like bobbin as a collector to position and align individual polymer nanofibres into parallel arrays [5]. Fennessey used a high speed rotating take-up wheel [6], while Dalton [7] and Liu [8] suspended electrospun nanofibres between two grounded plate electrodes while rotating one of them. Wu *et al.* applied three parallel electrodes in the vicinity of a rotating-drum collector to ensure more narrowly-aligned nanofibre bundle [9]. Dabirian *et al.* [10] used a negative charged bar to place the nanofibrous strands created by electrospinning on the surface of a rotating drum. Bazbouz and Stylios [11] employed two parallel circular plates standing upright

to obtain three-dimensionally aligned nanofibre bundle and yarn.

Methods for yarn production primarily based on the application of an electric field to twist fibres have been introduced by Fennessey and Farris [6, 12], who linked and twisted unidirectional tows of electrospun nanofibres into yarns using an electric twister. Li *et al.* [13 - 16] and Pan [17] developed a method of conjugate electrospinning from oppositely charged electrospun nanofibres. Okuzaki [18] reported on centimetre-long fibres spontaneously electrospun into yarns vertically on the surface of a flat collector. Sarkar *et al.* produced highly-aligned nanofibre array through the biased AC electrospinning process [19]. Dabirian *et al.* employed two differently charged nozzles and a collector travelling through the air to form yarn continuously [10]. A study detailing a theoretical analysis of the distribution of the electrostatic field forming around spinning points was presented in [28].

Other works used fluid motion to twist nanofibres into yarns. Scardino applied an air vortex spinning method to impart twist to fibres, forming a core filament spun yarn [20]. In Yong's work an air turbulence twister was applied to increase cross linking between nanofibres and to apply twist to them [21]. Kataphinan *et al.* refer to collecting nanofibres off the surface of non-wetting liquids [22]. The electrospinning of a continuous fibre bundle yarn onto a liquid reservoir and then collecting the fibres has also been reported by Liu [23].

Furthermore self-bundling and self-assembling electrospinning methods of producing continuous polymer nanofibre yarns were described by Wang *et al.* [25] and also by Mondal *et al.* [25].

In this paper a novel electrospinning set-up is introduced to provide a simple method for generating aligned electrospun fibre yarn with lengths of about 50 cm. Compared to common electrospinning setups, a special saw-like collector is used. The purpose of the collector shape chosen is to align nanofibres in the space between the neighbouring lamellae by means of electric field distribution in the vicinity of the collecting device. We also developed a simple theoretical approach to explain the prevailing parallel orientation of pieces of the electrospinning jet during its looping motion in-between neighbouring collector lamellae. COMSOL Multiphysics software was used to reveal details of our analytical approach.

■ Material and methods

It is common for electrospun nanofibres to be deposited on a homogeneous metallic planar collector. Electric charges are transmitted together with electrospinning jet force nanofibres to form a random mesh. Our approach to produce short nanofibrous yarns is based on the employment of a special saw-like collector. Such a collector causes the inhomogeneous distribution of the field strength in its vicinity. Therefore nanofibres are preferentially deposited in strands on lamella tips with a parallel alignment between them. The arrangement of nanofibrous strands due to the field distribution is described in the theoretical part of the work.

Materials

Water soluble polyvinylalcohol SLOVIO (PVA) from Chemicke zavody Novaky (Slovakia) was used with an original concentration of 16 wt%. The mean molecular weight of this polymer is 130000 g/mol. Polyvinylalcohol was diluted in distilled water to a final concentration of 12 wt%.

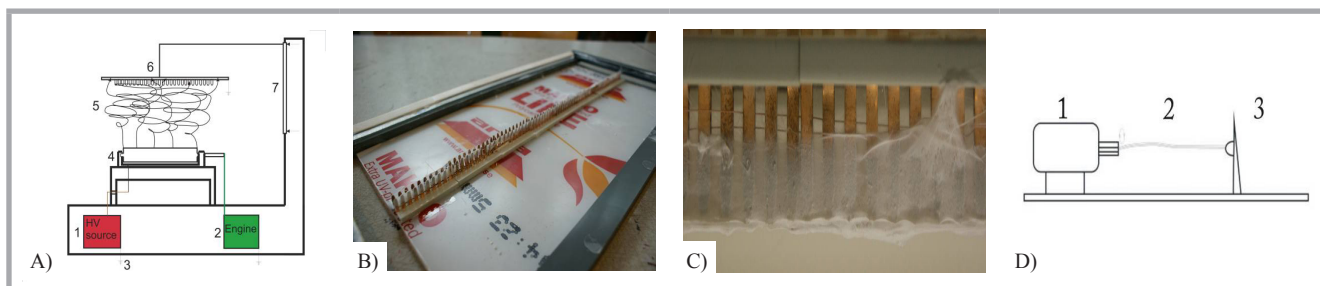


Figure 1. (A) Nanospider™ technology, 1 high voltage source, 2 engine, 3 grounding, 4 roller in the bath of a polymer solution, 5 nanofibres, 6 collector, 7 frame for regulation of the distance between the roller and collector; (B) Special saw-like collector; (C) Detail view of saw-like collector covered by nanofibrous layer (D) Twisting device, 1 engine, 2 nanofibrous bundle, 3 fixing frame.

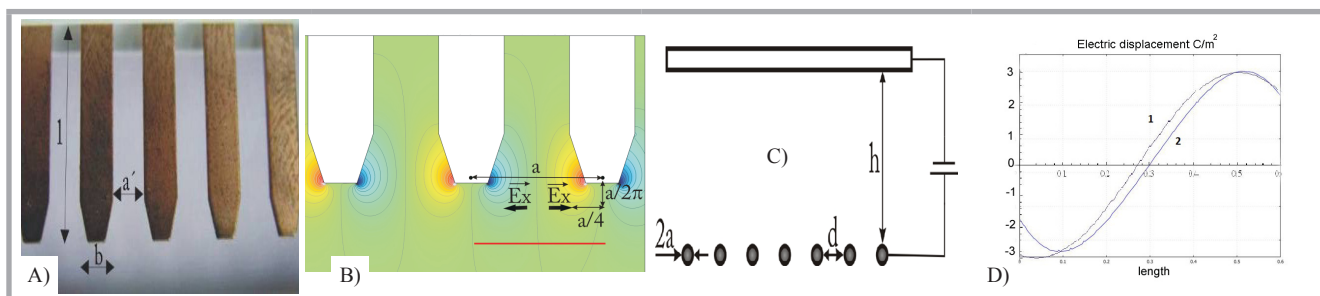


Figure 2. (A) Lamellae of the special saw-like collector; $l = 12$ mm, $a' = 3$ mm, $b = 3$ mm. COMSOL Multiphysics simulation: (B) Field strength x-component near two lamellae of the special saw-like collector; (C) A model of the saw-like collector, consisting of a grid of parallel and equidistant metallic rods. (D) Electrostatic strength component E_x along an abscissa in figure part B that is at a distance of $z = a/(2\pi)$ apart from the lamellae tips. Theoretical prediction obtained using Equation (3) is curve 2, COMSOL plotted outputs is line 1.

Electrospinning set-ups

Experiments were carried out using a needleless electrospinner - Nanospider. The needleless variant employed a cylindrical spinning electrode with a diameter of 14 mm and length of 83 mm that rotates slowly around its horizontally oriented axes in a bath of polymer solution, with a length of 100 mm, width of 30 mm and height of 15 mm, see **Figure 1.A**. This arrangement follows the idea of Nanospider™ introduced by Jirsak *et al.* [26]. The collector used, composed of copper lamellae with a vertical length of 11 mm, width of 1 mm, thickness of 3 mm and distance between neighboring lamellae of 3 mm, is depicted in **Figure 1.B** and **Figures 2.A, 2.B**. The distance between the rotating cylinder and collector was 120 mm. The polymer solution was placed on the roller surface as a consequence of its rotation. Taylor cones, as roots of a great number of electrospinning jets, rose from the top of the coated roller surface. Jets were attracted by a special saw-like collector. The collector was grounded while the roller was connected to the positive pole of a 300 Watt High Voltage DC Power Supply; model number PS/ER50N06.0-22; manufactured by Glassman High Voltage, INC. (USA) with output parameters: 0 - 50 kV, 6 mA.

All experiments were carried out at an ambient temperature of 21 ± 2 °C and

relative humidity of $40 \pm 2\%$. The voltage used for experiments with PVA was 45 kV. Polyvinylalcohol nanofibres were spun using the needleless roll apparatus for 15 minutes. **Figure 2.D** shows two curves: The first is the theoretical prediction obtained using **Equation 3** and the last represents outputs from the program COMSOL MULTIPHYSIC. A normalised curve of the amplitude is plotted as line number 2 in **Figure 2.B**. Both curves are similar.

Twisting a yarn

The nanofibrous layer deposited on the top of the saw-like collector was taken down. The head of the oriented nanofibrous strand was attached to the twisting device and the tail was clamped by a fix frame. Twist was obtained using the engine in the twisting device run with a rotation speed of around 750 r.p.m for 1 minute. This apparatus is shown in **Figure 1.D**. Oriented nanofibrous materials of 50 cm length produced using the electrospinning set-ups described equipped with the special saw-like collector were subsequently twisted.

Mechanical characterisations of yarns

The field strength distribution around the saw-like special collector composed of lamellae was investigated numerically using the electrostatic application mode

available in COMSOL Multiphysics (**Figure 3**).

Five samples of yarns were used for mechanical testing. The clamping length of each sample test was 1 cm. The strength of individual yarn pieces was measured using a VIBRODYN 400 dynamometer in the testing mode at a constant deformation rate. The device was connected to a VIBROSKOP 400, which enabled to measure the linear yarn density using mechanical oscillation frequency. The software provided automatic evaluation of yarn linear density (fineness), strength, tenacity and relative strength. The fineness of nanofibrous yarns was 394 ± 156 tex, elongation $50.37 \pm 7.39\%$,

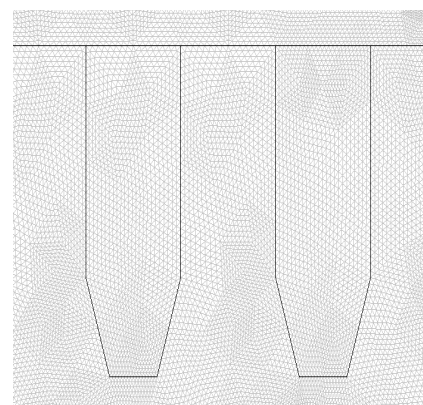


Figure 3. Lagrange - Quadratic mesh elements and mesh geometry.

Table 1. Elongation, ultimate tensile strength and relative strength of nanofibrous yarns of different values of yarns fineness.

Yarns fineness, tex	Elongation, %	Strength, cN	Relative strength, cN/tex
221	38,14	272,52	1,23
229	52,66	354,98	1,55
474	54,57	577,45	1,22
505	59,74	573,26	1,14
539	46,77	654,41	1,21

strength 487 ± 146 cN and relative strength 1.27 ± 0.14 cN/tex. There is only occasional information about the strength data of nanofibrous nanoyarn in literature. Ultimate tensile strain and strength values of the nanoyarn produced by us are presented in **Table 1**.

Theory and mathematical simulation

The analysis of the field distribution around the special saw-like collector was simplified to a two-dimensional model of the grid of parallel and equidistant metallic rods, see **Figure 2.C**. All rods have the same electric potential and are located perpendicularly to the saw plane in the centers of the lamellae edges, as shown in **Figure 2.C**. Analysis of the electrostatic field distribution will be restricted to the plane of the saw, i.e. (x, z) plane. The x -axis is horizontal, while the z one is vertical. The electrostatic potential of the problem, $\varphi(x, z)$ is proposed to be in the shape of a Fourier series, as introduced by Feynman *et al.* [27].

$$\varphi(x, z) = E_0 z + \sum_{n=1}^{\infty} F_n(z) \cos \frac{2\pi n x}{a} \quad (1)$$

where a is the spacing between neighboring nodes/lamellae and n denotes a particular harmonic component of the electrostatic potential φ , while $F_n(z)$ are unknown functions of coordinate z . The potential has to fulfill the Laplace equation $\partial \varphi(x, z) / \partial x + \partial \varphi(x, z) / \partial z = 0$ that holds in the space outside electric charges. The substitution from the Fourier series into

the Laplace equation allows to determine functions $F_n(z)$'s as follows

$$F_n(z) = A_n \exp\left(-\frac{2\pi n z}{a}\right) \quad (2)$$

The n -th harmonic Fourier component of the field decreases exponentially with increasing distance z from the lamella edge. The decays are determined by parameter n . The zero potential component ($n = 0$) is without any decay and the first one ($n = 1$) diminishes in the slowest manner. At a distance equal to $a/(2\pi)$ the first harmonic component prevails, while components with $n > 1$ diminish rapidly. The electrostatic field is nearly uniform at distances only a few times greater than a away from the collector, i.e., $\varphi_0(z) = E_0 z$, meaning that the oscillating terms ($n > 0$) are negligible at these distances.

We will analyze the distribution of the first harmonic x -component of the field strength, $E_{1,x}$, at distance $a/(2\pi)$ away from the collector, aiming at locating its extremes. The x -component of the field strength is defined as $E_x = -\partial \varphi / \partial x$. Therefore from **Equations 1** and **2** φ /follows that

$$E_{1,x}(x, z) = A_1 \frac{2\pi}{a} \exp\left(-\frac{2\pi z}{a}\right) \sin \frac{2\pi x}{a} \quad (3)$$

Function $E_{1,x}$ has its extreme values at points $x = a/4$. Every odd extreme is a maximum and every even a minimum. Therefore at a point with coordinates $x = a/4$ and $z = a/(2\pi)$ the field strength component points to the left, while at

point $x = 3a/4$ and $z = a/(2\pi)$ component $E_{1,x}$ points to the right side. This field distribution forces charged jet segments to form parallel strands bridging the space between neighbouring lamellae, since jet components are stretched horizontally and attracted to the neighbouring lamellae.

The field strength distribution around the special saw-like collector composed of lamellae was investigated numerically using the electrostatic application mode available in COMSOL Multiphysic. Computer simulation results are shown in detail in **Figures 2.B** and **2.D**. The surrounding environment is considered as a square area that contains models of principal parts of the setup, particularly the spinning roll electrode and collector. The electrostatic potential value at the spinning electrode was +25 kV, while the collector was kept at -25 kV. The simulation was run with 14889 mesh points and 29056 elements including 720 boundary elements. The mesh elements were Lagrange – Quadratic and are presented in **Figure 3**. The surrounding environment was modelled as air.

Results and discussion

Structure of nanofibrous materials

The cross section morphology of the yarn is depicted using a Zeiss ultra plus electron microscope, shown in **Figure 4.A**. A detail view of the nanoyarn surface is depicted in **Figure 4.B**. The photograph in **Figure 4.C** demonstrates the final yarn length - 50 cm. The diameter of nanoyarn varies from 0.7 to 1.2 mm. Its linear density, i.e., the fineness, is 1.3 cN/tex. The macro image obtained using the light microscope of the saw-like collector with nanofibrous mat is shown in **Figure 4.D**.

The program NIS elements 3.0 was used for measuring fibre diameters. Nanofibre diameter data were collected from 100 measurements taken from SEM microphotographs similar to that in **Figure 4.B**. The average value of these diameter measurements is 441.61 nm

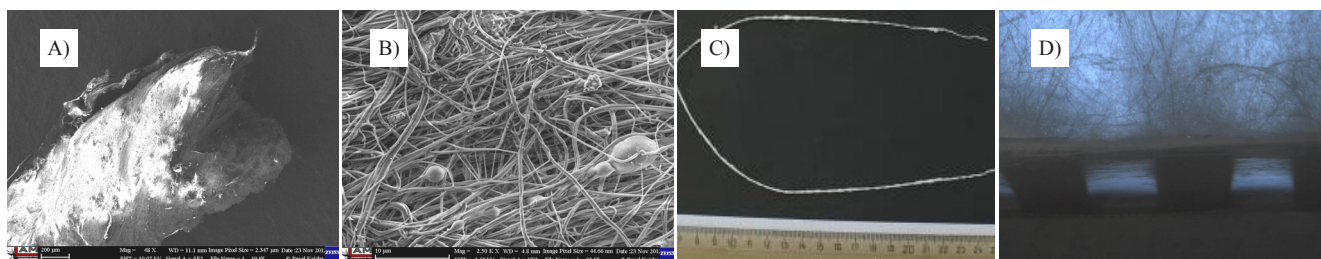


Figure 4. (A) SEM picture of the cross section of PVA nanoyarn. (B) Detail view of surface of PVA yarn depicted using a Zeiss microscope. (C) Oriented nanofibrous material photograph of the PVA nanoyarn produced. (D) Detailed structure of the saw-like collector with deposited PVA layer, depicted using a macro scope.

with standard deviation 143.93. These results show that the fibres are fine and relatively uniform. The deep frozen yarn was broken in liquid nitrogen. The liquid nitrogen caused the material to become fragile and break.

Conclusion

A simple method has been illustrated to prepare nanoyarns using the special saw-like collector. The electrostatic field in the vicinity of the collector enables to deposit parallel nanofibrous strands. Oriented strands were then twisted to form nanoyarns with a length of about 50 cm. Yarns were prepared from PVA polymer solution. The nanoyarns produced, consisting of nanofibres, can be used in various new applications including tissue engineering, forensic probes, linear materials for chromatography as well as for fabric and knitted textile compounds of nanoyarns.



Acknowledgments

David Lukas is grateful for funding provided by MSMT project CARSILA ME10145, entitled "Plasma modifications of nanofibrous materials for applications in biology". Jiri Chvojka would also like to thank Research grant GAČR: P208/12/0105, Polymer Solutions in an External Field: Molecular Understanding of Electrospinning, for funding.

References

- Formhals A. *Artificial thread and method of producing same filed*. US patent 2,187,306; 1940.
- Formhals A. *Producing of artificial fibers from fiber forming liquids*. US patent 2,323,025; 1943.
- Formhals A. *Method and apparatus for spinning*, US patent 2,349,950; 1944.
- Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. *Compos Sci Technol* 2003; 63: 2223–2253.
- Zussman, E.; Theron, A.; Yarin, A. L., Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays, *Appl Phys Lett* 2003, 82,973.
- Fennessey SF, Farris RJ. Mechanical Behavior of Nonwoven Electrospun Fabrics and Yarns. *Polymer* 2004a; 45: 4217–25.
- Dalton PD, Klee D, Möller M. Electrospinning with dual collection rings. *Polymer* 2005; 46(3): 611–614.
- Liu LQ, Eder M, Burgert I, Tasis D, Prato HM, Wagner D. One-step electrospun nanofiber-based composite ropes. *Appl Phys Lett*. 2007; 90: 83108–83110.
- Wu H, Lin DD, Zhang R, Pan WJ. Oriented Nanofibers by a Newly Modified Electrospinning Method. *Am Ceram Soc* 2007; 90: 632–634.
- Dabirian F, Hosseini Y, Hosseini Ravanidi SA. *J Text I* 2007; 98: 237–241.
- Bazbouz MB, Stylios GKJ. Alignment and optimization of nylon 6 nanofibers by electrospinning. *Appl Polym Sci* 2008b; 107: 3023–3032.
- Fennessey SF, Farris RJ. Fabrication of aligned and molecularly oriented electrospun polyacrylonitrile nanofibers and the mechanical behavior of their twisted yarns. *Polymer* 2004b; 45: 4217–25.
- Li XS, Yao C, Song TY. Chin. Pat. Appl. CN200510038571.5, March 25, 2005.
- Li XS, Yao C, Sun, FQ. Chin. Pat. Appl. CN200510095384.0, Nov. 11, 2005b.
- Li XS, Sun FQ, Yao C, Song TY. 231st, Conjugate electrospinning of continuous nanofiber yarn of poly(L-lactide)/nanotriacalcium phosphate nanocomposite, American Chemical Society National Meeting, Atlanta, March 26–30, 2006.
- Li X, Yao C, Sun F, Song T, Li Y, Pu Y. Conjugate Electrospinning of Continuous Nanofiber Yarn of Poly(L-lactide)/Nanotriacalcium Phosphate Nanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science* 2008; 107: 3756–3764.
- Pan H, Li L, Hu L, Cui X. Continuous aligned polymer fibers produced by a modified electrospinning method. *Polymer* 2006; 47–14: 4901–4904.
- Okuzaki H, Takahashi T, Miyajima N, Suzuki Y, Kuwabara T. Spontaneous Formation of Poly(p-phenylenevinylene) Nanofiber Yarns through Electrospinning of a Precursor. *Macromolecules* 2006; 39: 4276–4278.
- Sarkar S, Deevi S, Tepper G. *Macromol Rapid Commun* 2007; 28: 1034–1039.
- Scardino FL, Balonis RJ. *Fibrous structures containing nanofibrils and other textile fibers*. US patent 6,308,509; 2001.
- Yong KH. *A process of preparing continuous filament composed of nanofiber*. European Patent WO073442; 2005.
- Kataphinan W, Dabney S, Smith D, Reneker D. *Fabrication of electrospun and encapsulation into polymer nanofibers*. Book of Abstracts. The Fiber Society, Spring Meeting, May 23–25, 2001.
- Liu H, Pan Z, Wang J, Suzhou DX. Gongkeban 2007b; 27: 36.
- Wang X, Zhang K, Zhu M, Yu H, Zhou Z, Chen Y, Hsiao BS. Continuous polymer nanofiber yarns prepared by self-bundling electrospinning method. *Polymer* 2008; 49: 2755–2761.
- Mondal A, Borah R, Mukherjee A, Basu S, Jassal M, Agrawal AK. Electrospun Self-Assembled Nanofiber Yarns. *Journal of Applied Polymer Science* 2008; 110: 603–607.
- Jirsak O, Sanetnik F, Lukas D, Kotek V, Martinova L, Chaloupek J. *A method of Nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method*. US Patent, WO2005024101, 2005.
- Feynman RP, Leighton RB, Sands M. *Lectures on Physics Vol 2*, Addison – Wesley Publishing company, New York, 1971.
- Krucińska I, Komisarczyk A. Electrostatic field in electrospinning with a multicapillary head – modelling and experiment. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 2009; 17; 3: 38–44.

Received 08.11.2011 Received 04.12.2012



FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe

reaches all corners of the world! It pays to advertise your products and services in our magazine! We'll gladly assist you in placing your ads.

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2012-907

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.12.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.11.2013**
(Věstník č. 46/2013)

(51) Int. Cl.:

D04H 1/728 (2012.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
D01D 5/00 (2006.01)
D01F 1/00 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Technická univerzita v Liberci, Liberec 1, CZ
EGU - HV Laboratory a.s., Praha 9 - Běchovice, CZ

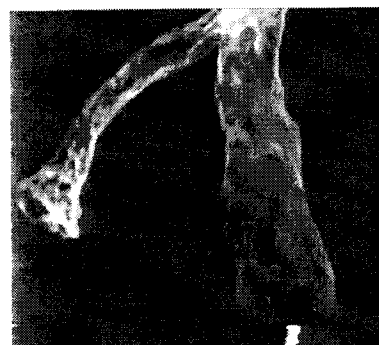
(72) Původce:

Kočiš Lubomír Ing., Ostrá, okres Nymburk, CZ
Pokorný Pavel Ing., Frýdlant v Čechách, CZ
Lukáš David Prof. RNDr. CSc., Liberec 6, Rochlice, CZ
Mikeš Petr Ing., Mníšek u Liberce, Chrastava, CZ
Chvojka Jiří Ing., Liberec 2, CZ
Košťáková Eva Ing. Bc. Ph.D., Turnov, CZ
Beran Jaroslav Prof. Ing. CSc., Liberec 30, CZ
Bílek Martin Doc. Ing. Ph.D., Liberec 1, CZ
Valtera Jan Ing., Dvůr Králové nad Labem, CZ
Amler Evžen Prof. RNDr. CSc., Praha 7, CZ
Buzgo Matěj Mgr., Turňa nad Bodvou, SK
Mičková Andrea Mgr., Bratislava, SK

(74) Zástupce:

Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, Cejl 38, Brno, 60200

způsobem je elektricky neutrální, a je tvořen polymerními nanovlákný uspořádanými do nepravidelné mřížkové struktury, ve které jednotlivá nanovlákná v úsecích jednotek mikrometrů mění svůj směr.



(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby polymerních nanovláken
zvlákňováním roztoku nebo taveniny
polymeru v elektrickém poli a lineární útvar
z polymerních nanovláken vytvořený tímto
způsobem**

(57) Anotace:

Při způsobu výroby polymerních nanovláken, kdy se polymerní nanovlákná vytváří silovým působením elektrického pole na roztok nebo taveninu polymeru, který se nachází na po vrchu zvlákňovací elektrody, se elektrického pole pro elektrostatické zvlákňování střídavě vytváří mezi zvlákňovací elektrodou (1), na kterou se přivádí střídavé napětí, a ionty (30, 31) vzduchu a/nebo plynu vytvořenými a/nebo přivedenými do jejího okolí. Podle fáze střídavého napětí se na zvlákňovací elektrodě (1) vytváří polymerní nanovlákná s opačným elektrickým nábojem a/nebo s úseky s opačným elektrickým nábojem, která se po svém vzniku v důsledku působení elektrostatických sil shlukují do lineárního útvaru ve formě kabílku nebo pruhu, který se volně pohybuje v prostoru ve směru gradientu elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody (1). Lineární útvar vytvořený tímto

5 Oblast techniky

Vynález se dále týká lineárního útvaru z polymerních nanovláken
10 vytvořeného tímto způsobem.

Typickým produktem všech dosud známých postupů pro zvlákňování roztoků nebo tavenin polymerů v elektrickém poli využívajících statické jehlové zvlákňovací elektrody (trysky, kapiláry, apod.) nebo bezstrunové zvlákňovací elektrody (rotující válec, ve směru své délky se pohybující struna, rotující spirála, natíraná struna apod.) je plošná vrstva náhodně propletených a elektricky souhlasně nabitých nanovláken. Ta má sice v kombinaci s dalšími podpůrnými či krycími vrstvami celou řadu využití, zejména v oblasti filtrace a hygienických prostředků, avšak pro mnoho dalších aplikací a pro další zpracování standardními textilními technologickými postupy je využitelná pouze omezeně. Tyto aplikace totiž principiálně vyžadují spíše lineární útvary z nanovláken, případně složitější prostorové struktury připravené dalším zpracováním takových lineárních útvarů.

25. V tomto smyslu popisuje např. US 2008265469 způsob vytváření lineárního útvaru z nanovláken, který je založen na přímém odtahování nanovláken z několika dvojic proti sobě uspořádaných trysek nabitých opačným elektrickým nábojem, a jejich následným spojením. Tímto způsobem se však dosahuje pouze nízkého produkčního výkonu, který navíc není, díky vzájemnému ovlivňování elektrických polí jednotlivých trysek, konstantní.

30. Výsledný lineární útvar tak má značně nerovnoměrnou a náhodou strukturu a

malou pevnost v tahu, díky čemuž se tento způsob hodí pouze pro experimentální použití v laboratoři.

US 20090189319 popisuje způsob výroby lineárního útvaru z nanovláken stočením plošné vrstvy nanovláken vytvořené běžným elektrostatickým zvlákňováním. I takto připravený lineární útvar má pouze omezenou pevnost v tahu a není vhodný pro praktické využití. Způsob stáčení plošné vrstvy nanovláken je navíc technologicky poměrně složitý a zdoluhavý, přičemž dosahuje pouze nízké produktivity, díky čemuž je i tento způsob využitelný jen v omezeném laboratorním měřítku.

Další možností přípravy lineárního útvaru z nanovláken je použití sběrné elektrody dle WO 2009049564, která v jedné z popsanych variant obsahuje systém singulárních elektrických nábojů uspořádaných na úsečce, nebo na obvodu otáčejícího se disku. Vytvářená nanovlákná se přitom přednostně ukládají podél těchto elektrických nábojů a vytvářejí tak lineární útvary. Pevnost v tahu takto vytvořených útvarů přitom může být vyšší než u útvarů připravených některým z předchozích způsobů, avšak pro praktické využití je stále nedostatečná. Další nevýhodou tohoto postupu je relativně malá dosažitelná délka vytvořeného lineárního útvaru z nanovláken, která je omezená maximální délkou sběrné elektrody. Díky tomu nelze ani tento postup úspěšně použít v průmyslovém měřítku.

Cílem vynálezu je odstranit nebo alespoň zmírnit nevýhody stavu techniky a navrhnout způsob pro výrobu polymerních nanovláken, který by umožňoval mj. i výrobu dále použitelného nebo standardními textilními technologickými procesy zpracovatelného lineárního útvaru z polymerních nanovláken, a přitom byl dostatečně produktivní a průmyslově využitelný.

Podstata vynálezu

Cíle vynálezu se dosáhne způsobem pro výrobu polymerních nanovláken zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli, při kterém se polymerní nanovlákná vytváří silovým působením elektrického pole na roztok nebo taveninu polymeru, který se nachází na povrchu zvlákňovací elektrody. Jeho podstata přitom spočívá v tom, že elektrické pole pro elektrostatické

20 Cíle vynálezu se dále dosáhne také lineárním útvarem z polymerních nanovláken vytvořeným tímto způsobem, jehož podstata spočívá v tom, že je elektricky neutrální a že je tvořen polymerními nanovláknými uspořádanými do nepravidelné mřížkové struktury, ve které jednotlivá nanovlákná v úsecích jednotek mikrometrů mění svůj směr. Díky této struktuře pak tento útvar
25 dosahuje lepších mechanických parametrů než lineární útvary vytvářené dosud známými způsoby, přičemž je možné ho dále zpracovávat standardními textilními technologickými postupy, např. mu udělit zákrut a vytvořit z něj nit nebo přízi, apod.

Na přiložených výkresech je na Obr. 1 schematicky znázorněna jedna z variant zařízení pro provádění způsobu pro výrobu polymerních nanovláken

zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli podle vynálezu a princip tohoto způsobu, na Obr. 2 snímek Taylorových kuželů vytvořených na vrstvě roztoku polymeru, na Obr. 3 snímek lineárního útvaru z nanovláken z polyvinyl butyralu vytvořeného způsobem podle vynálezu, na Obr. 4 SEM snímek tohoto útvaru při zvětšení 24x, na Obr. 5 SEM snímek tohoto útvaru při zvětšení 100x, na Obr. 6 SEM snímek tohoto útvaru při zvětšení 500x, na Obr. 7 SEM snímek jiné části tohoto útvaru při zvětšení 500x, na Obr. 8 SEM snímek tohoto útvaru při zvětšení 1010x, a na Obr. 9 SEM snímek tohoto útvaru při zvětšení 7220x s odměřenými průměry jednotlivých vláken.

10.

provádění

Příklady uskutečnění vynálezu

Způsob pro výrobu polymerních nanovláken podle vynálezu je založen na zvlákňování roztoku nebo taveniny polymeru, který je uložen na povrchu zvlákňovací elektrody nebo se na něj kontinuálně nebo přerušovaně dodává, přičemž ke zvlákňování dochází prostřednictvím střídavého elektrického napětí přiváděného na tuto zvlákňovací elektrodu. Ve variantě zařízení k provádění tohoto způsobu znázorněné na Obr. 1 je znázorněna zvlákňovací elektroda 1 tvořená statickou tyčinkou propojenou se zdrojem 2 střídavého napětí, avšak v dalších neznázorněných variantách lze k provádění způsobu podle vynálezu použít libovolný jiný známý typ, resp. tvar zvlákňovací elektrody 1 – jako např. statickou zvlákňovací elektrodu 1 tvořenou tryskou, jehlou, tyčinkou, lištou apod. nebo jejich svazkem, nebo pohyblivou hladinovou zvlákňovací elektrodu 1 tvořenou rotujícím válcem, rotující spirálou, rotujícím diskem, či jiným rotujícím tělesem, nebo ve směru své délky se pohybující strunou, atd. Obecně lze jako zvlákňovací elektrodu 1 použít v podstatě libovolné statické nebo pohyblivé těleso, které je alespoň lokálně vypouklé v místě uložení nebo přivádění roztoku nebo taveniny polymeru.

Po přivedení střídavého napětí na zvlákňovací elektrodu 1 se dle aktuální fáze a polarity tohoto napětí vytváří elektrické pole pro zvlákňování mezi touto zvlákňovací elektrodou 1 a opačně nabitými ionty 30 nebo 31 okolního vzduchu nebo jiného plynu přivedeného a/nebo průběžně přiváděného do jejího okolí. Tyto ionty 30 nebo 31 se přitom v okolí zvlákňovací elektrody 1 vytváří nebo jsou do něj přitahovány v důsledku na ni přivedeného napětí. V neznázorněné

30.

variantě provedení je pak možné do blízkosti zvlákňovací elektrody 1 umístit a/nebo nasměrovat vhodný zdroj kladných a/nebo záporných iontů 30 nebo 31, který je v provozu alespoň před a/nebo během zahájení zvlákňování. Silovým působením těchto elektrických polí se pak na povrchu vrstvy 4 roztoku nebo taveniny polymeru na povrchu zvlákňovací elektrody 1 vytváří tzv. Taylorovy kužely (viz Obr. 2), ze kterých se následně vydlužují jednotlivá polymerní nanovlákná. Střídavé napětí na zvlákňovací elektrodě 1, resp. periodická změna polarizace zvlákňovací elektrody 1 přitom nedovolí systému vzduch (plyn)–zvlákňovaný roztok nebo tavenina polymeru, která je v kontaktu se zvlákňovací elektrodou 1, dosáhnout trvale rovnovážného stavu distribuce iontů 30, 31 vzduchu (nebo plynu), takže zvlákňování může probíhat v podstatě libovolně dlouho, např. do vyčerpání předem stanoveného množství roztoku nebo taveniny polymeru. Přitom se během experimentů překvapivě ukázalo, že pokud je frekvence střídavého napětí dostatečně vysoká (minimálně cca 35 Hz), nedojde během změny polarizace střídavého napětí k zániku Taylorových kuželů.

Při tomto způsobu se vytvořená polymerní nanovlákná formují do lineárního prostorového útvaru, který bezprostředně po opuštění zvlákňovací elektrody 1 splňuje definici aerogelu, tj. porézního ultralehkého materiálu (vyráběného dosud odstraněním kapalně části z gelu nebo polymerního roztoku). Díky pravidelné změně fáze a polarity střídavého napětí na zvlákňovací elektrodě 1 přitom jednotlivá nanovlákná, nebo dokonce různé úseky jednotlivých nanovláken nesou různé elektrické náboje, v důsledku čehož se téměř ihned po svém vzniku působením elektrostatických sil shlukují do kompaktního lineárního útvaru ve formě kábílku nebo pásu. Vlivem střídavě se opakující polarity elektrických nábojů svých úseků přitom polymerní nanovlákná pravidelně mění svůj směr v úsecích o délce jednotek mikrometrů (což je patrné např. z Obr. 3 až 8), a vytváří nepravidelnou mřížkovou strukturu vzájemně hustě provázaných nanovláken s opakujícími se místy kontaktu mezi nimi. Díky této struktuře, která je podstatně odlišná od struktury podobných útvarů vytvořených elektrostatickým zvlákňováním pomocí stejnosměrného elektrického napětí, dosahuje tento útvar také podstatně lepších mechanických parametrů.

Po svém vzniku se tímto způsobem vytvořený lineární útvar z polymerních nanovláken pohybuje ve směru gradientu vytvářených elektrických polí kolmo nebo téměř kolmo od zvlákňovací elektrody 1. Sám je přitom elektricky neutrální, neboť během jeho pohybu prostorem dochází ke vzájemné rekombinaci opačných elektrických nábojů jednotlivých nanovláken nebo jejich úseků. Díky tomu je možné ho snadno mechanicky zachytit na statickém nebo pohyblivém kolektoru, který principiálně nemusí být elektricky aktivní (tj. nemusí na něj být přivedeno žádné elektrické napětí) a ani nemusí být vytvořen z elektricky vodivého materiálu. Zachycený lineární útvar je přitom díky relativně velkým přitažlivým silám mezi jednotlivými nanovláknami (elektrostatické síly mezi dipóly, mezimolekulární síly, případně adhezní síly) schopen dalšího zpracování standardními textilními technologickými postupy, např. je možné mu udělit zákrut a vytvořit z něj přízi, nit, apod., případně ho zpracovat jiným způsobem.

Při zachycení lineárního útvaru z nanovláken na plošný statický nebo pohyblivý kolektor, jako např. desku, mřížku, pás, apod. se pak tento lineární útvar na ploše takového kolektoru ukládá do plošné vrstvy polymerních nanovláken. Tu lze, stejně jako samostatný lineární útvar z polymerních nanovláken, použít např. jako podklad pro pěstování buněk ve tkáňovém inženýrství, neboť jejich morfologie se blíží přírodním strukturám mezibuněčné hmoty více, než u jiných, k tomuto účelu dosud používaných struktur. Kromě toho je však lze použít i v jiných technických aplikacích využívajících nanovláknenné – mikrovláknenné materiály, např. filtraci, apod.

Při sérii ověřovacích pokusů se na zvlákňovací elektrodu 1 tvořenou elektricky vodivou tyčinkou o průměru 1 cm přivádělo střídavé elektrické napětí o velikosti 12 až 36 kV, s frekvencí 35 až 400 Hz. Tímto způsobem se přitom bez použití sběrné elektrody zvlákňovaly příkladné roztoky polyvinyl butyralu (PVB), polykaprolaktonu (PCL) a polyvinyl alkoholu (PVA). Přitom bylo pozorováno, že se zvyšující se frekvencí střídavého napětí se snižoval výkon zvlákňování a vznikala jemnější nanovláknna.

Příklad 1

Prostřednictvím zvlákňovací elektrody 1 tvořené elektricky vodivou tyčinkou o průměru 1 cm se zvlákňoval roztok 10 % hmotnostních polyvinyl butyralu (PVB) ve směsném rozpouštědle obsahujícím vodu a alkohol v poměru 9:1. Tento roztok se přitom na zvlákňovací elektrodu 1 dodával kontinuálně pomocí lineární pumpy v množství 50 ml/hod. Střídavé efektivní napětí přiváděné na zvlákňovací elektrodu 1 přitom bylo nastaveno na 25 kV s frekvencí 50 Hz. Dosažený výkon zvlákňování byl 5 g sušiny nanovláken/hod. Snímky tímto způsobem vytvořeného lineárního útvaru s různým přiblížením jsou na Obr. 3 až Obr. 9, přičemž je z nich zřejmé, že byla skutečně vyráběna nanovlákná o průměru menším než 1 μ m, a ze snímků na Obr. 5 až Obr. 8 i mřížková struktura vytvořeného lineárního útvaru s patrnou změnou směru jednotlivých nanovláken.

Příklad 2

Stejným způsobem jako v příkladu 1, se zvlákňoval roztok polyvinyl alkoholu (PVA) rozpuštěného ve vodě. Tento roztok se přitom diskontinuálně nanášel štětcem na horizontálně uspořádanou zvlákňovací elektrodu 1 tvořenou drátem o průměru 2 mm a délce 200 mm. Střídavé efektivní napětí přiváděné na zvlákňovací elektrodu 1 přitom bylo nastaveno na 30 kV s frekvencí 300 Hz. Dosažený výkon zvlákňování byl přitom cca 4 g sušiny nanovláken/hod.

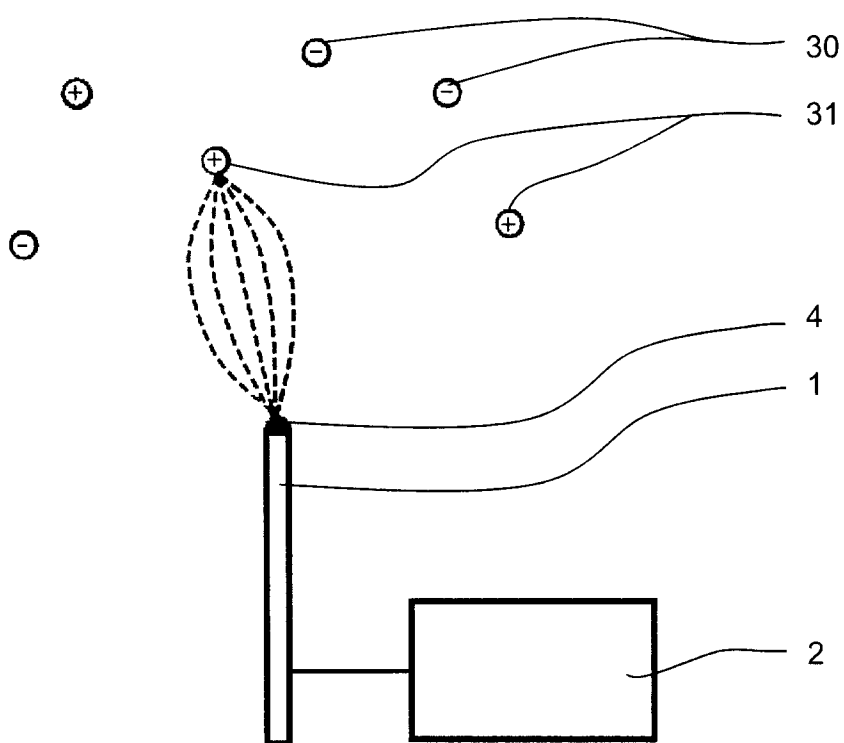
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob pro-výrobu polymerních nanovláken, při kterém se polymerní nanovláčna vytváří silovým působením elektrického pole na roztok nebo taveninu polymeru, který se nachází na povrchu zvlákňovací elektrody, **vyznačující se tím, že** elektrické pole pro elektrostatické zvlákňování se střídavě vytváří mezi zvlákňovací elektrodou (1), na kterou se přivádí střídavé napětí, a ionty (30, 31) vzduchu a/nebo plynu vytvořenými a/nebo přivedenými do jejího okolí, přičemž se dle fáze střídavého napětí na zvlákňovací elektrodě (1) vytváří polymerní nanovláčna s opačným elektrickým nábojem a/nebo s úseky s opačným elektrickým nábojem, která se po svém vzniku v důsledku působení elektrostatických sil shlukují do lineárního útvaru ve formě kabílku nebo pruhu, který se volně pohybuje v prostoru ve směru gradientu elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody (1).
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** lineární útvar z polymerních nanovláken se zachytává na statickém nebo pohyblivém kolektoru.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** lineární útvar z polymerních nanovláken se zachytává na plošném statickém nebo pohyblivém kolektoru, na který se ukládá do plošné vrstvy polymerních nanovláken.
4. Způsob podle libovolného z předcházejících nároků, **vyznačující se tím, že** na zvlákňovací elektrodu (1) se přivádí střídavé napětí o 12 až 36 kV, s frekvencí 35 až 400 Hz.
5. Lineární útvar z polymerních nanovláken vytvořený způsobem podle libovolného z nároků 1, 2 nebo 4, **vyznačující se tím, že** je elektricky neutrální, a že je tvořen polymerními nanovláknami uspořádanými do nepravidelné mřížkové struktury, ve které jednotlivá nanovláčna v úsecích jednotek mikrometrů mění svůj směr.

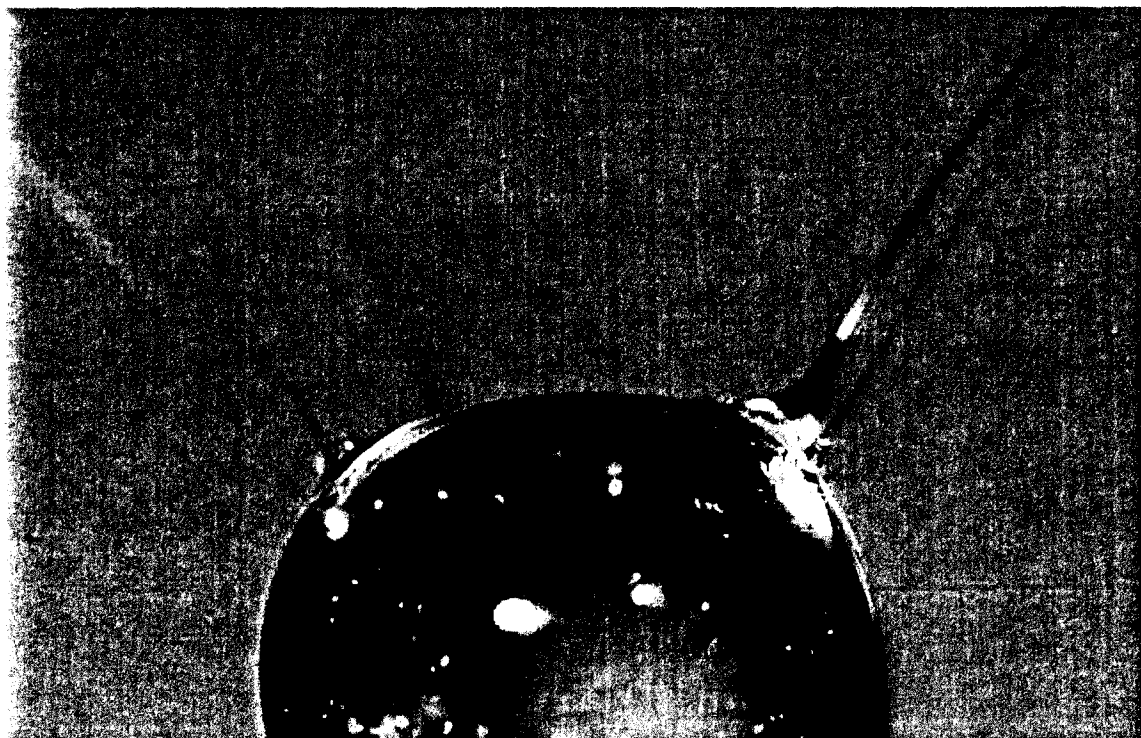
TISK

SV 2012-907

1/5



Obr. 1



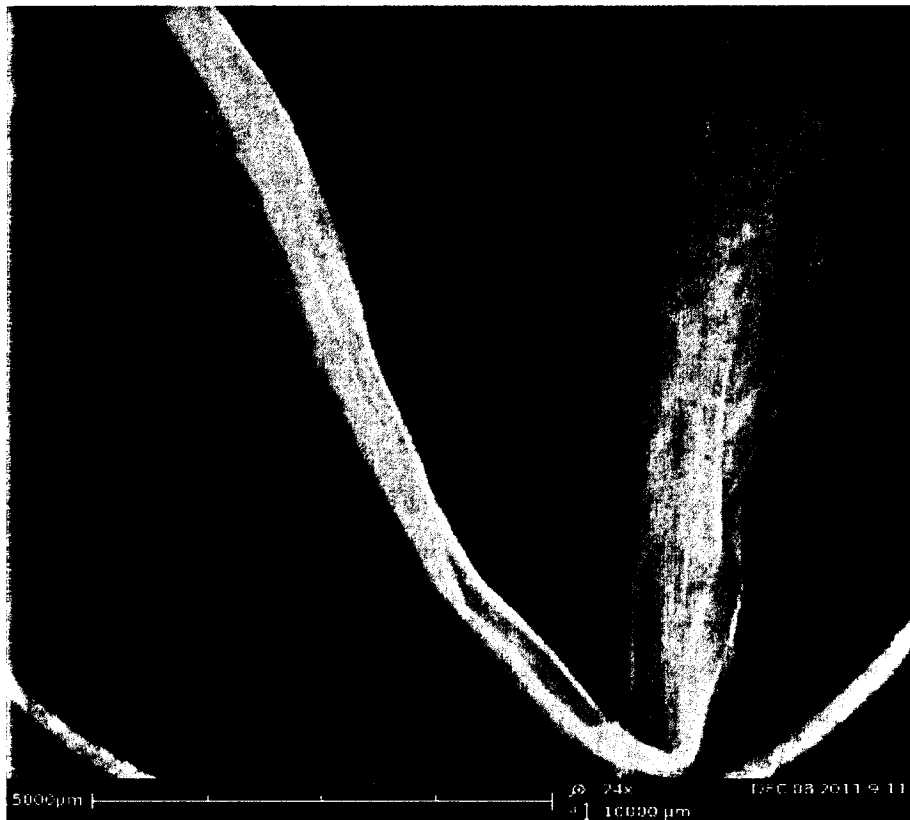
Obr. 2

T1 S12

2/5



Obr. 3

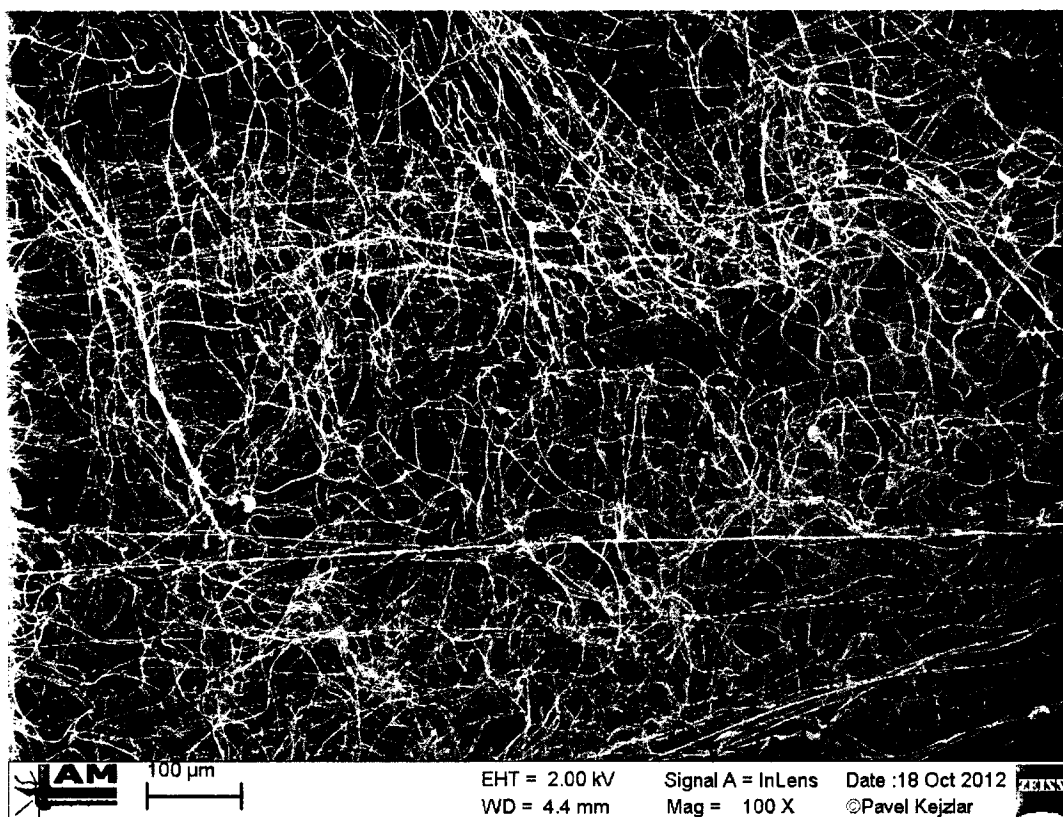


Obr. 4

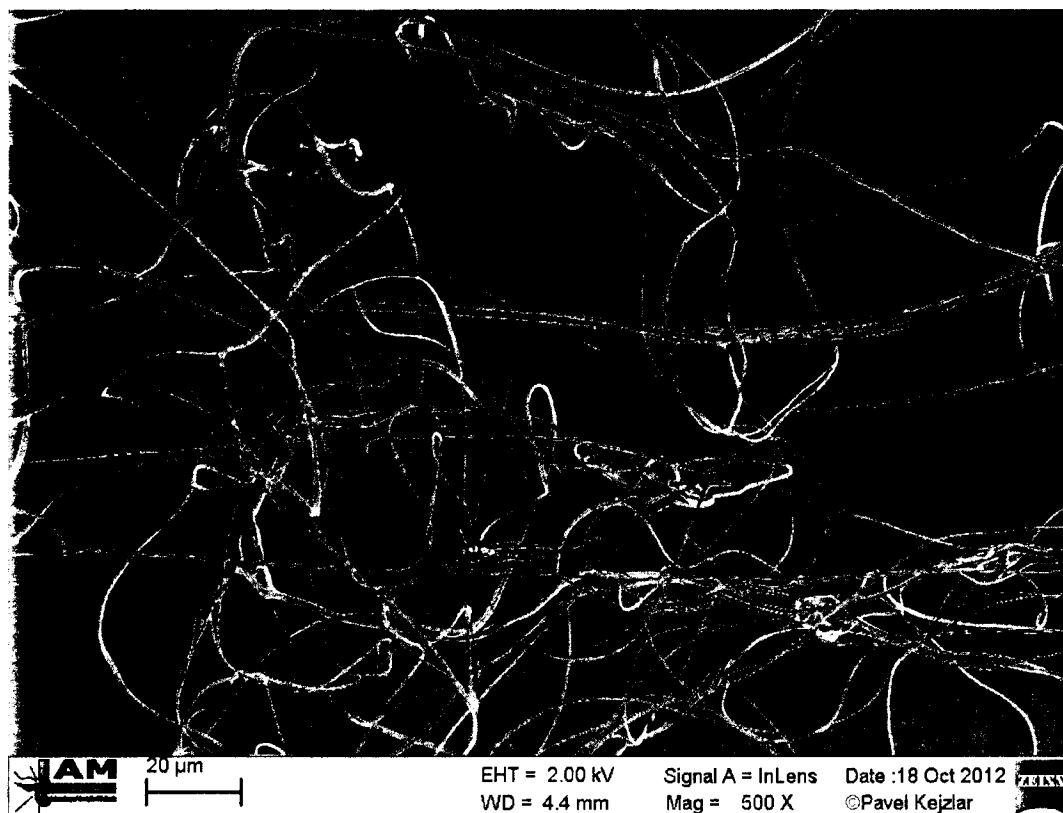
TISK

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

3/5



Obr. 5

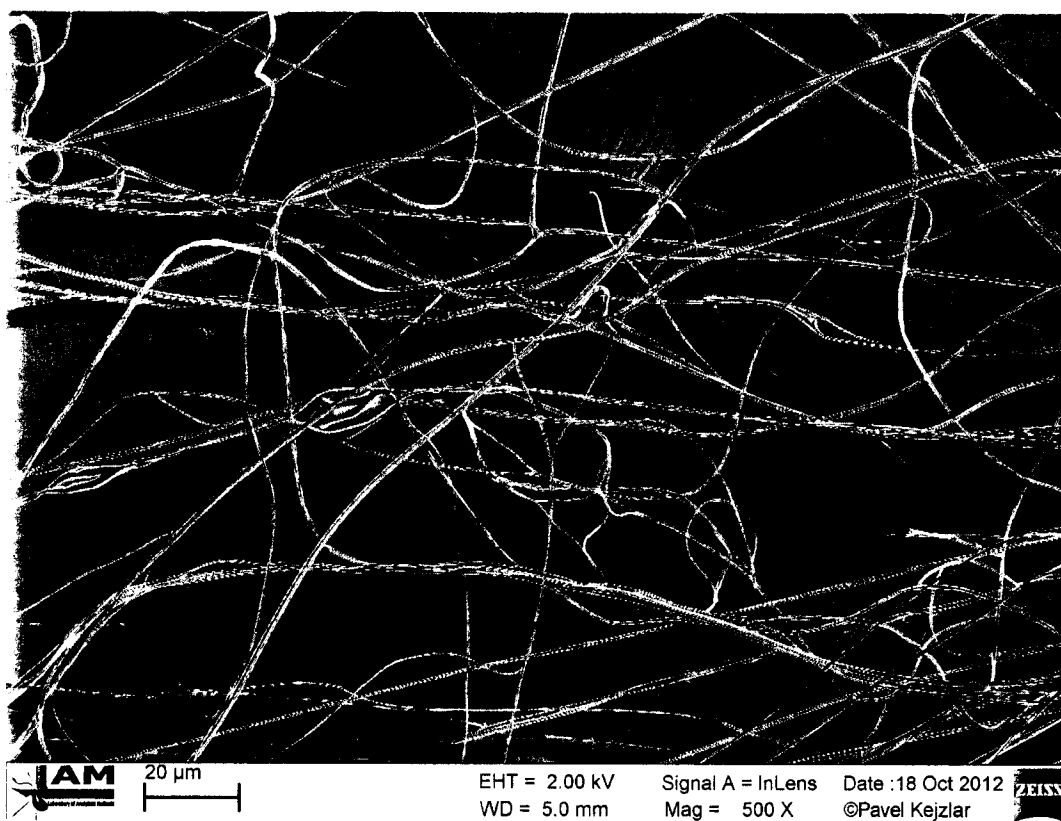


Obr. 6

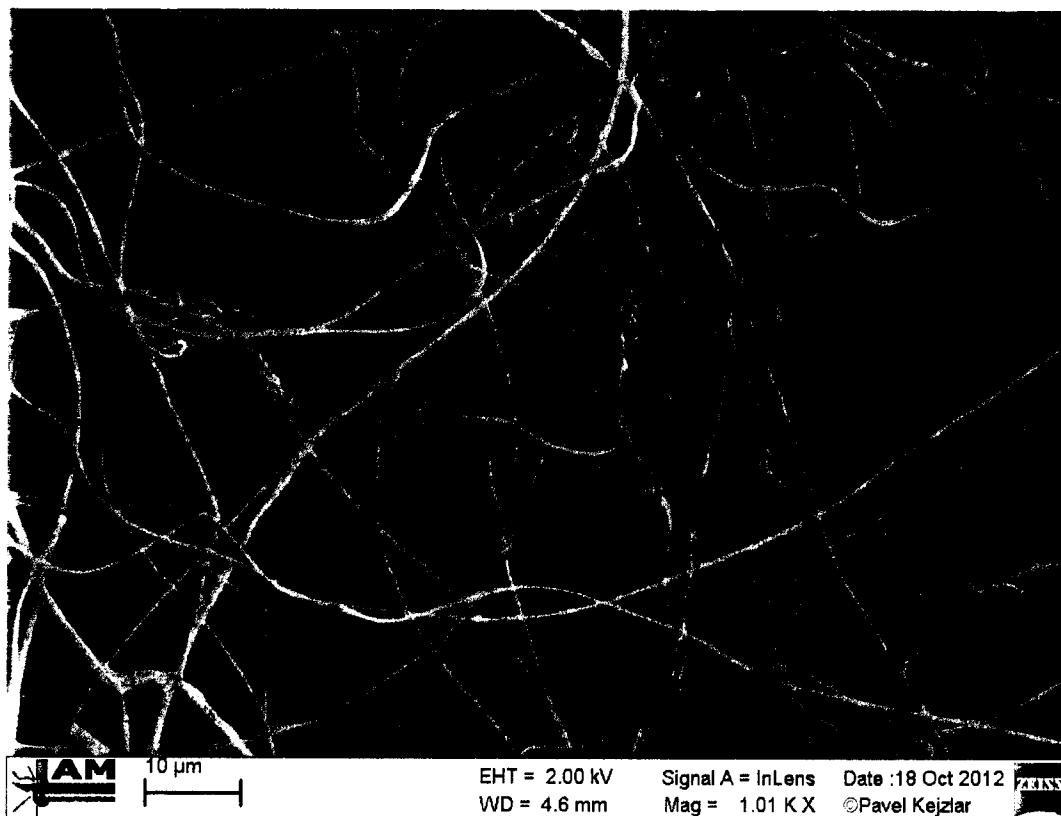
T13K

17.10.12

4/5



Obr. 7

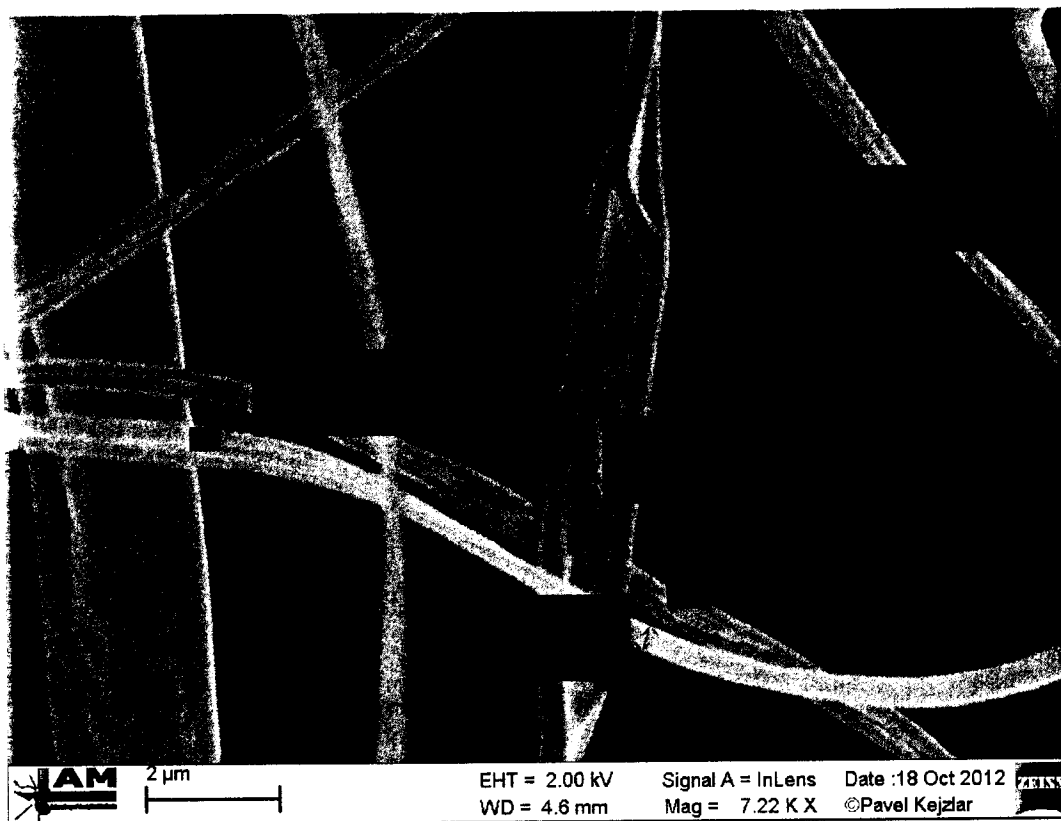


Obr. 8

TISK

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

5/5



Obr. 9

Příloha č. 3

Tunak, Maros; Antoch, Jaromir; Kula, Jiri; Chvojka Jiri.: Estimation of fiber system orientation for nonwoven and nanofibrous layers: local approach based on image analysis, TEXTILE RESEARCH JOURNAL Volume: 84 Issue: 9 Pages: 989-1006 Published: JUN 2014 (IF 1,443)

Patent: Lineární vlákenný útvar s pláštěm z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar tvořící jádro, způsob a zařízení k jeho výrobě

Estimation of fiber system orientation for nonwoven and nanofibrous layers: local approach based on image analysis

Textile Research Journal
2014, Vol. 84(9) 989–1006
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0040517513509852
trj.sagepub.com


Maroš Tunák¹, Jaromír Antoch², Jiří Kula¹ and Jiří Chvojka³

Abstract

Analysis of textile materials often includes measurement of structural anisotropy or directional orientation of textile object systems. To that purpose, the real-world objects are replaced by their images, which are analyzed, and the results of this analysis are used for decisions about the product(s). Study of the image data allows one to understand the image contents and to perform quantitative and qualitative description of objects of interest. This paper deals in particular with the problem of estimating the main orientation of fiber systems. Firstly, we present a concise survey of the methods suitable for estimating orientation of fiber systems stemming from the image analysis. The methods we consider are based on the two-dimensional discrete Fourier transform combined with the method of moments. Secondly, we suggest abandoning the currently used global, that is, all-at-once, analysis of the whole image, which typically leads to just one estimate of the characteristic of interest, and advise replacing it with a “local analysis”. This means splitting the image into many small, non-overlapping pieces, and estimating the characteristic of interest for each piece separately and independently of the others. As a result we obtain many estimates of the characteristic of interest, one for each sub-window of the original image, and – instead of averaging them to get just one value – we suggest analyzing the distribution of the estimates obtained for the respective sub-images. The proposed approach seems especially appealing when analyzing nonwoven textiles and nanofibrous layers, which may often exhibit quite a large anisotropy of the characteristic of interest.

Keywords

Fiber system, digital image, Fourier analysis, covariance matrix analysis, moments of image, nanofibers layers, histogram, kernel density estimator

Fibrous textile materials are used almost everywhere around us. They have various applications, for example fabric for clothing, materials for technical purposes (automotive, composites, geotextiles, building industry, filtering, etc.) or materials for special purposes (textiles for medicine, structures for scaffolds and tissue engineering, etc.). It is well known that the actual properties of all textile materials substantially depend on the properties of individual fibers, together with the arrangement and/or structure that they form.

Arrangement and/or directional orientation of individual fibers greatly influences mechanical properties of linear and planar textiles. Analogously, orientation of fibers in fibrous porous materials influences properties such as permeability, absorbance of liquids, etc. Many papers confirm an intuitive feeling that fiber

orientation considerably influences properties of the final textile products. For examples, see Tahir and Tafreshi,¹ Maoa and Russella² and Murugan and

¹Department of Textile Evaluation, Faculty of Textile Engineering, Technical University of Liberec, Czech Republic

²Department of Probability and Mathematical Statistics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague, Czech Republic

³Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Technical University of Liberec, Czech Republic

Corresponding author:

Maroš Tunák, Technical University of Liberec, Faculty of Textile Engineering, Department of Textile Evaluation, Studentská 2, CZ 461 17 Liberec, Czech Republic.
Email: maros.tunak@tul.cz

Ramakrishna.³ The first paper is devoted to the modeling of in-plane and through-plane fiber orientations on a fibrous medium's transverse permeability. The second one demonstrates that fiber orientation is a major factor influencing the anisotropy of permeability. Finally, in the third paper its authors show that the orientation of the fibers is one of the most important features of a perfect tissue scaffold made of nanofibers.

From this standpoint, measurement of the directional orientation of a fibrous structure is an important part of quantitative measurements, both in textile metrology and practice. Here we must not neglect to mention an especially influencing series of papers by Pourdeyhimi and Davis⁴ and Pourdeyhimi et al.⁵ devoted to measuring fiber orientations. Another important branch of research in the domain of fiber orientation of fibrous materials is its mathematical modeling. For recent stimulating papers, see, for example, Murugan and Ramakrishna,³ Neckář and Das⁶ and Neckář et al.⁷

Recall that although the first automated image analysis appeared in 1990, most of the measurements are currently performed either manually or with the use of specialized software, where evaluation of object orientation is not performed automatically but is affected by subjective human decisions. Therefore, the interest in fully automatic measurement is growing in an attempt to decrease costs of manufacturing; see, for example, Tsai and Huang^{8,9} or Kang et al.¹⁰

Processing image data allows us to understand image content and to perform quantitative and qualitative descriptions of objects of interest. These objects are either randomly placed or they follow a certain directional placement. In textiles, typical objects can be linear textiles, fibers, threads, cross-sections of fibers, etc., and the systems containing these objects can, in general, be planar textiles, webs, fiber layers, woven fabrics, knitted fabrics, nonwoven textiles, nanofibrous layers, cross-sections of layers or projections of three-dimensional (3D) structures to two dimensions, etc.

In this paper we concentrate especially on estimation of fiber orientation of nanofibrous and nonwoven layers. One of the main tools utilized in this paper is discrete Fourier transform, which has been used for image analysis for a very long time, and which has often been applied both in textile research and industrial applications. As noticed by Wood¹¹ and Ravandi and Toriumi,¹² Fourier transform also allows pattern characterization and measuring the changes in pattern definition and estimation of directionality and density of yarns on fabric surfaces. The second main tool used is analysis of the sample image covariance matrix. Relevant literature and some basic results are discussed in more detail in the following section.

This paper is organized as follows. In the following section, four methods suitable for estimation of the fibers' orientation, that is, rose of directions, spectral approach, moment approach, and a combination of the spectral and moment approaches, are described. As already mentioned, among the main tools are two-dimensional discrete Fourier transform (2DDFT) and eigenvalue decomposition of the sample image covariance matrix. The first of the novelties of this paper is in the *Combining spectral and moment approaches in estimation of fiber orientation* section, where a combination of spectral and moment methods is suggested in an effort to increase advantages of both approaches. Further, the third section concentrates on the main new idea of this paper, which consists of abandoning the currently used "global approach", in which it is typical to characterize the fiber orientation in the entire image using just one number (index), and replacing it with a "local approach". This new approach means splitting the image into many smaller, non-overlapping sub-windows, estimating the fibers' orientation in these sub-windows separately and providing the user with an estimate of the distribution of the fiber orientation in these sub-windows. A big advantage of this suggested approach is that it allows us to characterize the fiber orientation in materials that do not exhibit isotropic structure, for which the characterization by one number (index) can be totally misleading. Examples of its application to both real and simulated data are presented. We would like to emphasize that the proposed algorithms were tested especially on images of nanofibrous and nonwoven layers.

Estimation of fiber orientation

In this section we describe four methods that have been shown to be useful for the estimation of fiber orientation. Firstly, in the *Estimation of structural anisotropy of planar systems* section, we concentrate on estimation of the structural anisotropy of planar systems using the rose of directions, rose of intersections, and angular density. Secondly, in the *Spectral approach and estimation of fiber orientation* section, we turn to estimation of the fiber orientation via spectral approach. The main tool here is the 2DDFT. Thirdly, in the *Moments of the image function and estimation of fiber orientation* section, we show that sample moments of the image file and the corresponding sample covariance matrix contain a lot of information that can be used for the estimation of the fiber orientation. Finally, in the *Combining spectral and moment approaches in estimation of fiber orientation* section we show how the spectral- and moment-based approaches can be mutually combined.

Estimation of structural anisotropy of planar systems

The quantitative characteristics of structural anisotropy in planar systems are of practical interest in the domain of estimating the fiber orientation. Among them, the rose of directions $R(D)$ and the rose of intersections $R(I)$, the polar plot of the mean density of intersections of the fiber system with the line of given orientation, seem to be most popular. Therefore, *angular density* $f(\alpha)$ of lengths of threads or fibers, that is, density of lengths of threads or fibers oriented in an angular segment $\alpha \pm \alpha/2$, is one of the most typical characteristics of planar anisotropy. The polar plot of $f(\alpha)$ is called the *rose of directions*. The estimate of $R(D)$ is accessible by means of stereological lattice testing systems or by using an image analyzer, which may not be available to everybody. Therefore, a simple experimental graphical method for estimation of $f(\alpha)$ is worthy of our interest. Let us concisely summarize the basic idea behind one of the proposals; for details see Rataj and Saxl.¹³

This method uses the set of angles $\alpha_1, \dots, \alpha_n$ situated at the top of a fiber system that is monitored for construction of the rose of intersections $R(I)$. The rose of directions as an estimate of function $f(\alpha)$ is obtained graphically from the rose of intersections $R(I)$ through the construction of the so-called Steiner compact. As Rataj and Saxl^{13,14} pointed out, $R(I)$ is unfortunately an indirect characteristic of the anisotropy and serious difficulties may be encountered when calculating $R(D)$ from $R(I)$, because an estimate of the second derivative of $R(I)$ is needed. The maximal number of angles n that is affordable in practice is, according to the experience of the authors of this paper, at most $n=18$. Otherwise the method becomes non-precise and time consuming.

Results of the method of the rose of directions have been included in this paper to offer an opportunity to compare our newly suggested approach with a totally different one, which is used as a standard in many places.

Spectral approach and estimation of fiber orientation

Techniques of image analysis based on the spectral approach are especially suitable for describing textural images; images of planar textiles can be considered good examples. We prefer to use the 2DDFT, which transforms images from the spatial domain to the frequency domain. The key point is that dominating directions (gradients of image function) in the directional textures correspond to large magnitudes of frequency components distributed along the straight lines in the Fourier spectrum.⁸ The Fourier transform is

rotation-dependent. Indeed, rotating the original image by an angle will rotate the corresponding frequency plane by the same angle. Moreover, the transform of horizontal lines in the spatial domain appears as vertical lines in the Fourier domain, that is, a line in the spatial image and its transformation are orthogonal to each other. Due to this relationship, the Fourier transform is useful for describing regular (periodic) patterns in woven fabric images,^{10–12,15,16} where information about weft or warp sets of yarns is concentrated in the Fourier spectrum in the vertical or horizontal direction, respectively. In contrast, purely random textures, for example random noise, cause the frequency components in the power spectrum to be approximately isotropic and possess a nearly circular shape.⁹

Fourier spectrum and the properties mentioned above can be useful for description of structural anisotropy or directional orientation of textile object systems. There are several articles dealing with the measurement of fiber orientation distribution with the aid of Fourier transform. Measurement of fiber orientation in nonwovens is presented by Pourdeyhimi and Davis,⁴ Pourdeyhimi et al.⁵ and Jeddi et al.,¹⁷ where orientation is estimated by scanning the Fourier spectrum radially with annulus of a specific width at a radius from the center. Fiber orientations in simulated images of nonwovens are analyzed by Zhang et al.¹⁸

Estimation of directional orientation in fiber-objected systems with the aid of the Fourier transform can be found in various other engineering areas, for example surface characterization in mechanical engineering and metallography,^{19,20} estimation of cell and fiber orientation distribution in biology,^{21,22} determination of fiber orientation in composites,^{23,24} distribution of fiber orientation on paper surface,²⁵ etc.

Let us take a closer look at this method. Let $f(x,y)$ be the gray level at pixel coordinates (x,y) . Let the size of a spatial domain image be $M \times N$. The corresponding 2DDFT (for details see, e.g., Gonzales et al.,²⁶ p.108) is given by

$$F(u, v) = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-j2\pi \left(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N} \right)},$$

where $u = 0, 1, \dots, M-1$ and $v = 0, 1, \dots, N-1$ are frequency variables and $x = 0, 1, \dots, M-1$, $y = 0, 1, \dots, N-1$ are spatial variables. If $f(x,y)$ is a real function, its Fourier transform is a complex function. For the subsequent visual analysis it is suitable to calculate spectrum $|F(u,v)|$ and display it as an image. Recall that the power spectrum is defined as a squared modulus of the spectrum, that is, $P(u,v) = |F(u,v)|^2$. For a visual representation of $F(u,v)$ scaled to eight-bit gray levels, the spectrum is usually converted using the

log transformation (for details see, e.g., Gonzales et al.,²⁶ p.114):

$$Q(u, v) = \log(1 + |F(u, v)|).$$

Examples of textile fiber systems in the form of grayscale images and the corresponding spectra are displayed in Figures 1(a) and 1(b). Figure 1(a1) represents a system of simulated fibers with a preferred direction, and an image size of 800×800 pixels. Figure 1(a2) represents a system of real viscose fibers, with an image size of 500×500 pixels. Figure 1(a3) represents a nanofibrous layer, with an image size of 500×500 pixels.

Readers interested in the fast graphical representation of the directional arrangements of textile objects, which is based on 2DDFT, are referred to by Tunak and Linka,²⁷ where anisotropy estimation is performed summing all frequency components in the directional vector of a certain angle α through the whole range of angles. As an estimate of the rose of directions, the sums are plotted onto the polar diagram. The main advantages of this method include its speed and the

possibility of monitoring with a very small angular step (equal to one degree).

Moments of the image function and estimation of fiber orientation

As mentioned earlier, directions of significant frequency components corresponding to the dominating directions in the spatial domain can be found in the power spectrum. Therefore, it is appealing to transform the power spectrum to a binary image in which only significant frequencies remain, and then to analyze this binary image. In practice it means that we can concentrate on cluster(s) of white pixels as object(s) or region(s) of interest, which considerably simplifies the task.

It is well known that an important description of an image file is provided in its moments. For a two-dimensional (2D) image function $f(x, y)$ the moment of order (p, q) is defined (for details see, e.g., Gonzales et al.,²⁶ p.470) as

$$m_{pq} = \sum_x \sum_y x^p y^q f(x, y), \quad p, q = 0, 1, 2, \dots,$$

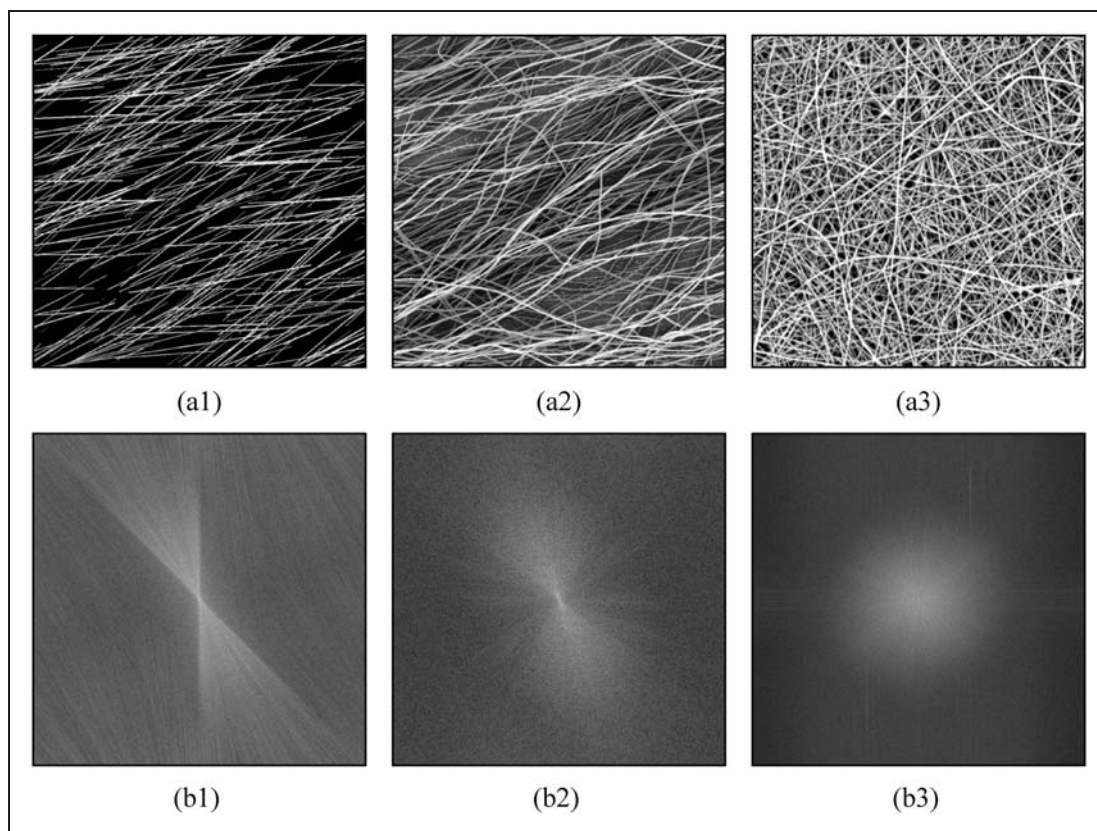


Figure 1. (a) Grayscale images of textile fibrous systems. (b) Corresponding power spectra.

and the central moments of order (p, q) are defined as

$$\mu_{pq} = \sum_x \sum_y (x - \bar{x})^p (y - \bar{y})^q f(x, y).$$

Recall that moments of the image function are interesting characteristics of objects in the image, that is:

- $m_{00}/(M \times N)$ in a binary image is a proportion of white points in the image;
- ratios of first-order moments m_{10} and m_{01} with the moment of zero order, that is, $\bar{x} = m_{10}/m_{00}$ and $\bar{y} = m_{01}/m_{00}$, determine the center of gravity of objects or regions of interest.

Another useful piece of information about the image can be found using the corresponding data covariance function:

$$\text{cov}f(x, y) = \begin{pmatrix} \frac{\mu_{20}}{\mu_{00}} & \frac{\mu_{11}}{\mu_{00}} \\ \frac{\mu_{11}}{\mu_{00}} & \frac{\mu_{02}}{\mu_{00}} \end{pmatrix}.$$

Indeed, the eigenvectors of $\text{cov} f(x, y)$ represent the major/minor axis of the data ellipse and are orthogonal to each other. Eigenvalues λ_1 and λ_2 of $\text{cov} f(x, y)$ are of the form

$$\lambda_i = \frac{\mu_{20} + \mu_{02}}{2} \pm \frac{\sqrt{4\mu_{11}^2 + (\mu_{20} - \mu_{02})^2}}{2}, \quad i = 1, 2.$$

The corresponding eigenvectors are the half-lengths of the major and minor axes. Moreover, the eigenvector corresponding to the largest eigenvalue represents a slope of the major eccentricity of an ellipse matrix, and the angle θ between the x -axis and direction of the major axis of the data ellipse is

$$\theta = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{2\mu_{11}}{\mu_{20} - \mu_{02}}\right),$$

while the eccentricity is given by

$$L = \sqrt{1 - \lambda_2/\lambda_1}.$$

For an example see Figure 8, where Figure 8(a) represents the image plane.

Combining spectral and moment approaches in estimation of fiber orientation

It feels appealing to combine the spectral approach and method of moments as follows.

1. At first we transform the power spectrum to a binary image via thresholding, so that only significant frequencies remain. Global thresholding was used for binarization of the image, with the threshold value being set to 0.5 of the maximum of the logarithm of the power spectra $Q(u, v)$. Directional orientation of significant frequencies in the frequency domain rotated by 90° corresponds to the directional orientation of objects in the spatial domain.
2. In the corresponding binary image we consider a cluster of white pixels as a region of interest and analyze it further. Orientation and length of major and minor axes of the “covering” ellipse (in red in Figure 8(b)) are computed only for the region of interest. It is obvious that its orientation reflects the predominant directions of objects in the spatial domain.

Examples

This section illustrates the considered approaches on examples of both real and simulated data.

Example 2.1

As the first example, we present in Figure 9(a) a 500×500 pixel grayscale image of viscose fibers. In Figure 9(b) the corresponding power spectrum rotated by 90° is shown, and in Figure 9(c) a binary image of its most significant frequencies is displayed.

Example 2.2

As the second example we present the situation well known from the literature, which has already been used by many other authors for a comparison between methods. Graphical representations of the results of all methods described above can be found in Figures 2(a)–(d). The results of all approaches are coherent and the correspondence in the preferred directions is evident.

- Figure 2(a) represents a Brodatz texture D15 (for details see Brodatz texture²⁸).
- Figure 2(b) shows the rose of directions evaluated by the simple graphical experimental method as described by Rataj and Saxl.¹³
- Figure 2(c) shows a polar diagram as an estimator of the rose of directions according to Tunak and Linka;²⁷ the main direction is marked by a small red circle.
- A red-color ellipse with the lengths of major and minor axes and its orientation can be seen in Figure 2(d).

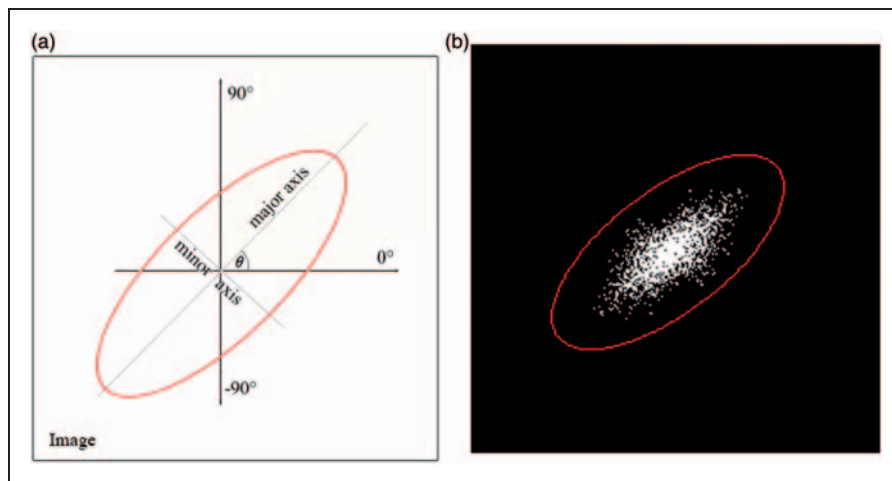


Figure 2. (a) Brodatz texture D15. (b) Rose of direction constructed by means of Steiner compact according to Rataj and Saxl.¹³ (c) Estimation of directional orientation according to Tunak and Linka.²⁷ (d) Estimate of directional orientation using image moments.

Estimation of the fiber system orientation for nonwoven textiles and nanofibrous layers: a local approach

The methods described in the second section are usually used for estimating the orientation of fibers in the whole image. However, it turns out that for textile fibrous layers, such as nonwoven textiles or nanofibrous layers, which often bear the stamps of non-homogeneity and anisotropy, more detailed analysis would be more suitable. The reason is that it is difficult, and often even impossible, to characterize the whole image by just one number that would not necessarily describe the reality satisfactorily.

This led us to an idea of abandoning the currently used “global approach”, for which it is typical to use just one number as an estimate of the characteristic of interest, which is difficult to interpret, especially for nonwoven and nanofibrous layers. Instead, it seems appealing to replace this “global point of view” with the “local one”. By the local point of view we mean splitting the image into many small, non-overlapping pieces (sub-windows) covering it, and estimating the characteristic of interest for each piece independently from the others. As a result we obtain many estimates of the characteristic of interest, one for each sub-window of the original image, and instead of averaging them in order to get just one value we analyze and further discuss distribution of these estimates.

Formally, as an estimator of the fiber orientation in every sub-window, any of the approaches described in the second section may be used. We suggest using the method described in the *Combining spectral and moment approaches in estimation of fiber orientation* section, that is, a combination of spectral and moment

approaches. The threshold value used should be half of the maximum of the logarithm of power spectrum calculated in the given sub-window. On the other hand, use of the rose of directions for small-sized sub-windows does not seem appropriate; see discussions in Rataj and Saxl.^{13,14}

Detailed description of the method

Let us describe our idea in more detail. At first, we divide the image area into K smaller, non-overlapping sub-windows of a certain size and estimate the direction arrangement for each sub-window separately. Instead of one value characterizing the whole image, we thus obtain K estimates of the parameter of interest, for example, fiber orientation, etc. We denote them T_1, \dots, T_K and estimate the distribution of T_i values by either histogram or kernel estimator. Recall that procedures for calculation of both histograms and kernel estimators are routinely available in all software packages and/or image analyzers. For details about these estimators, see, for example, Scott.²⁹ It is evident that the more evenly dispersed the values of T_i are, the more uniform the considered characteristic is.

The size of the whole image and splitting it into small sub-windows considerably influence the quality of the histogram and/or quality of the kernel density estimator for the density of fiber orientation. As shown and discussed by Scott,²⁹ sample sizes of 100–200 observations are reasonable for obtaining good-quality estimates of regular densities if the integrated mean square error is used as the quality measure. Notice that if we split an image of 500×500 pixels into sub-

windows of 30×30 pixels, it leads to slightly fewer than 300 sub-windows, which is adequate to produce good-quality estimates of the desired characteristic. The larger the image size is, the better estimates we will receive.

On the other hand, the size of the sub-window substantially influences the quality of fiber orientation estimates. Too-small sub-window sizes are not able to capture information about the fiber orientation, while too-large sub-window sizes do not bring new information. This phenomenon is illustrated in Figures 10(d)–(f). We are convinced that the optimal choice depends, among other circumstances, especially on the fiber thickness and curvature. In the case of nanofibrous layers we analyzed, the curvature is rather small. Unfortunately, we are not aware of any theoretical results that would help us to solve the problem of how to choose an optimal sub-window size, so for now we leave it an open problem. In the simulated example the thickness was set to one pixel, while in

experimental examples the typical thickness is, according to our measurements, between one and three pixels, sometimes larger. In subsection Examples we present the results for the sub-window size being 20–30 times the mean thickness of the fibers, which yielded good results.

Experimental design: polymers, processing parameters, and image capturing used

Three kinds of polymers were used for the presented experiments, all being dissolved in suitable solvent to prepare polymer solutions. Details of the experiments follow.

The first polymer used was water soluble polyvinylalcohol (PVA) 16 wt%, produced by Chemické Zavody Novaky, Slovakia, diluted to the concentration 12 wt%. Experiments were conducted with NanospiderTM; the distance between the roller and

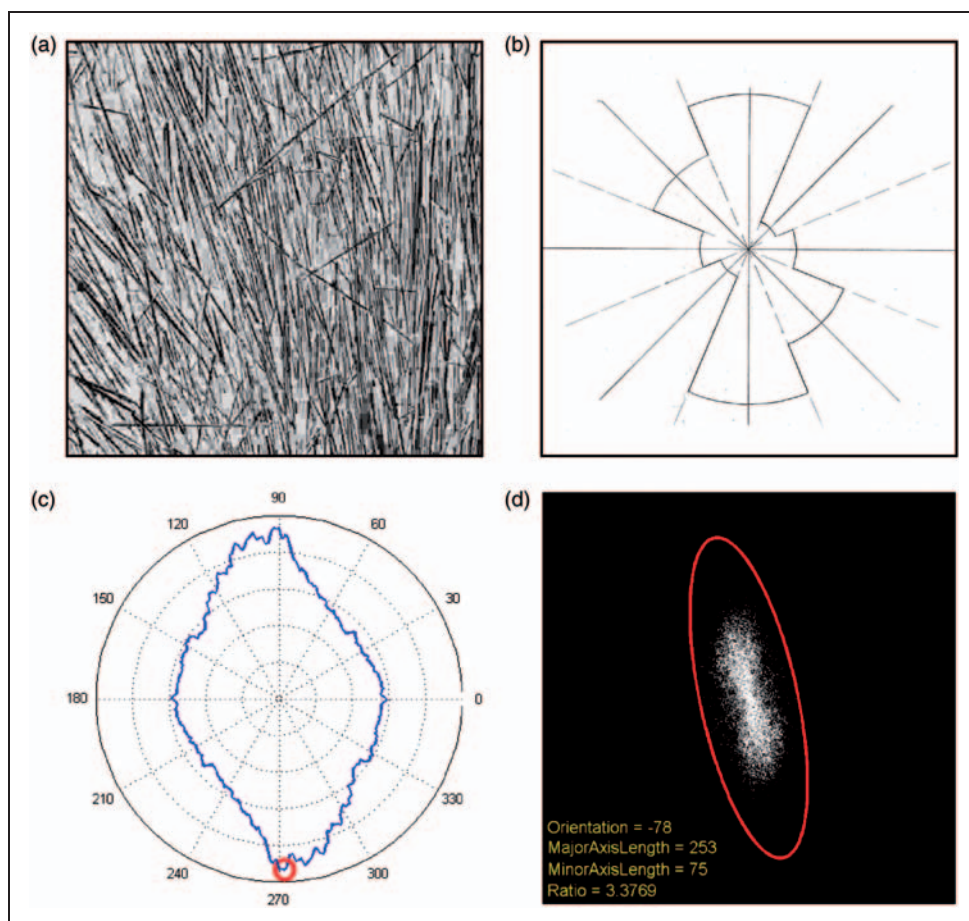


Figure 3. (a) Image of polyvinylidene fluoride nanofibers (1000×1000 pixels). (b) Estimates of orientation according to Tunak and Linka.²⁷ (c) and (d) Gray-level map of orientation (sub-window sizes 40×40 and 20×20 pixels). (e) and (f) Directional vectors in original image. (g) and (h) Density histogram and kernel estimates of the density of orientations.

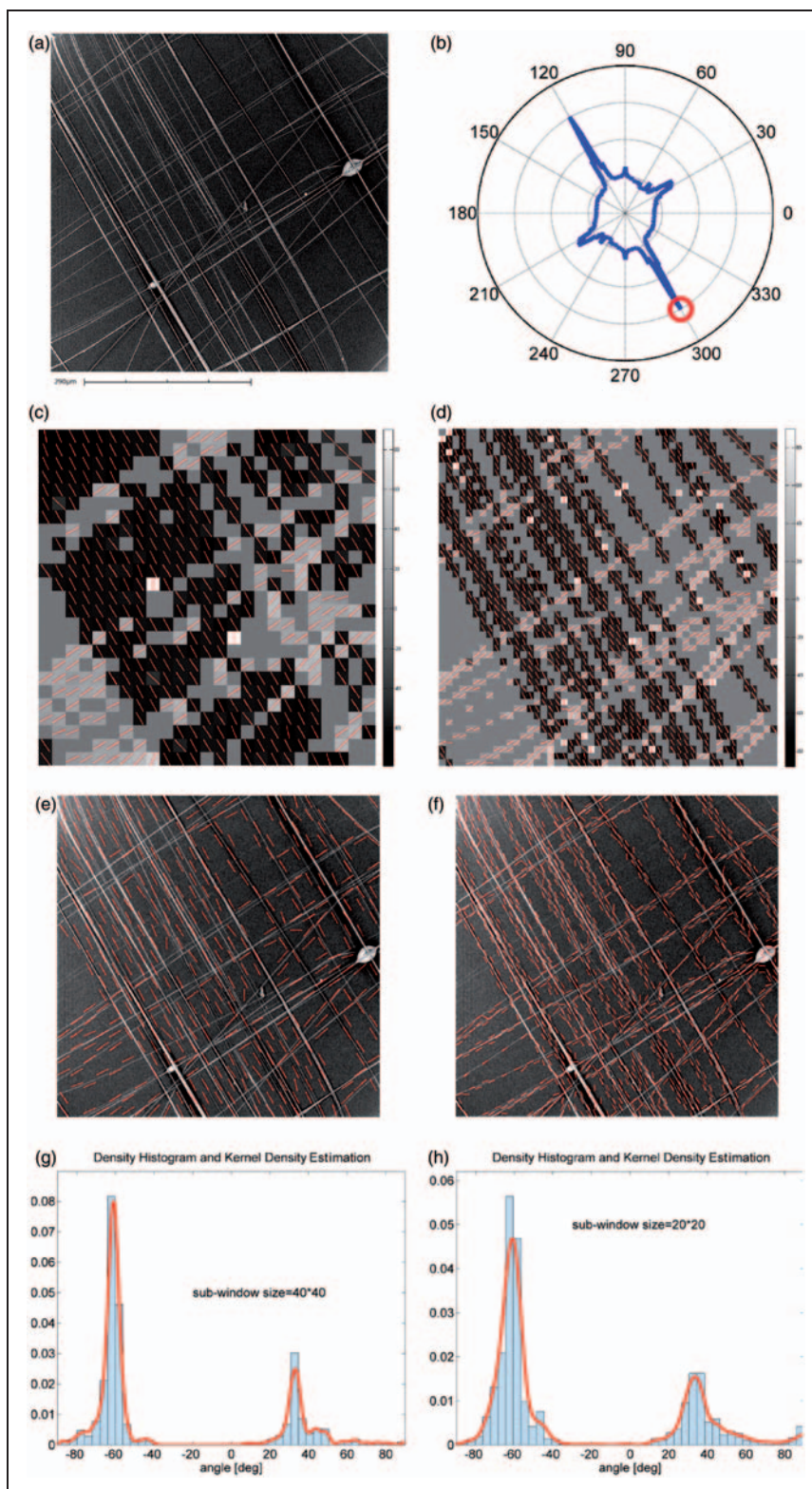


Figure 4. (a) Image of polycaprolactone nanofibers (1000×1000 pixels). (b) Estimates of orientation according to Tunak and Linka.²⁷ (c) Gray-level map of orientation (sub-window size 30×30 pixels). (d) Directional vectors in original image. (e) Density histogram and kernel estimates of the density of orientations.

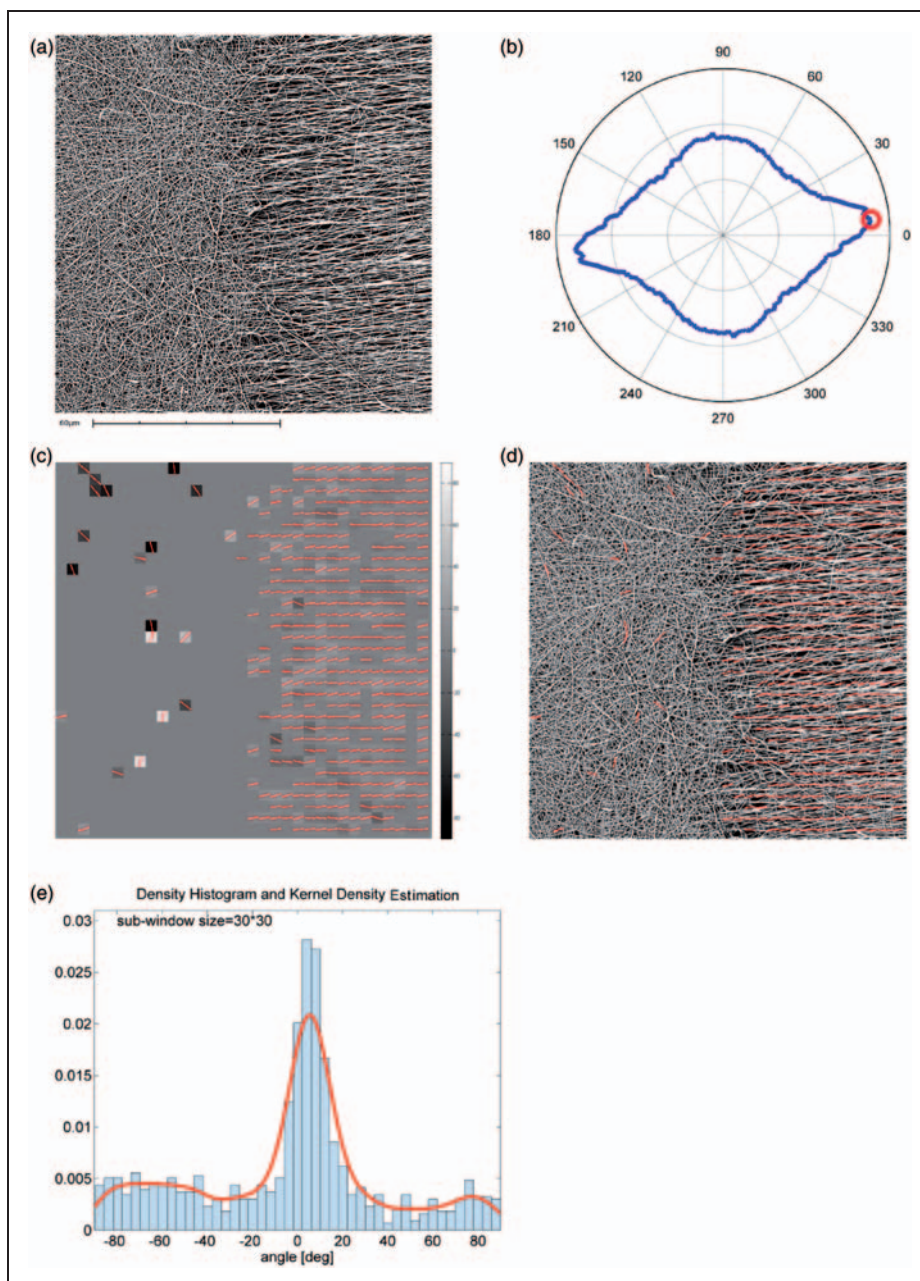


Figure 5. (a) Image of polyvinylalcohol nanofibers (1000×1000 pixels). (b) Estimates of orientation according to Tunak and Linka.²⁷ (c) Gray-level map of orientation (sub-window size 30×30 pixels). (d) Directional vectors in original image. (e) Density histogram and kernel estimates of the density of orientations.

the collector was 120 mm. The voltage used was 45 kV, the duration of the experiment 15 minutes, ambient humidity 40%. Selected results are shown in Figures 1(a3), 5, and 6.

The second polymer used was polycaprolactone (PCL) by Sigma Aldrich. It is biodegradable polyester with a low melting point and molecular weight $M_w = 45,000$. The final concentration was 16 wt% and chloroform and acetone (9:1) were used as solvents.

The distance between the syringe and the collector was 15 cm (Figures 4 and 7).

The third polymer used was polyvinylidene fluoride (PVDF), a highly non-reactive and pure thermoplastic fluoropolymer, prepared from Solef 1006 by Solvay Solexis with the melt flow index $MFI = 120$ g/min. For the experiment 16 wt% solution was prepared using dimethylacetamide (DMAc) as a solvent. Results are presented in Figure 3.

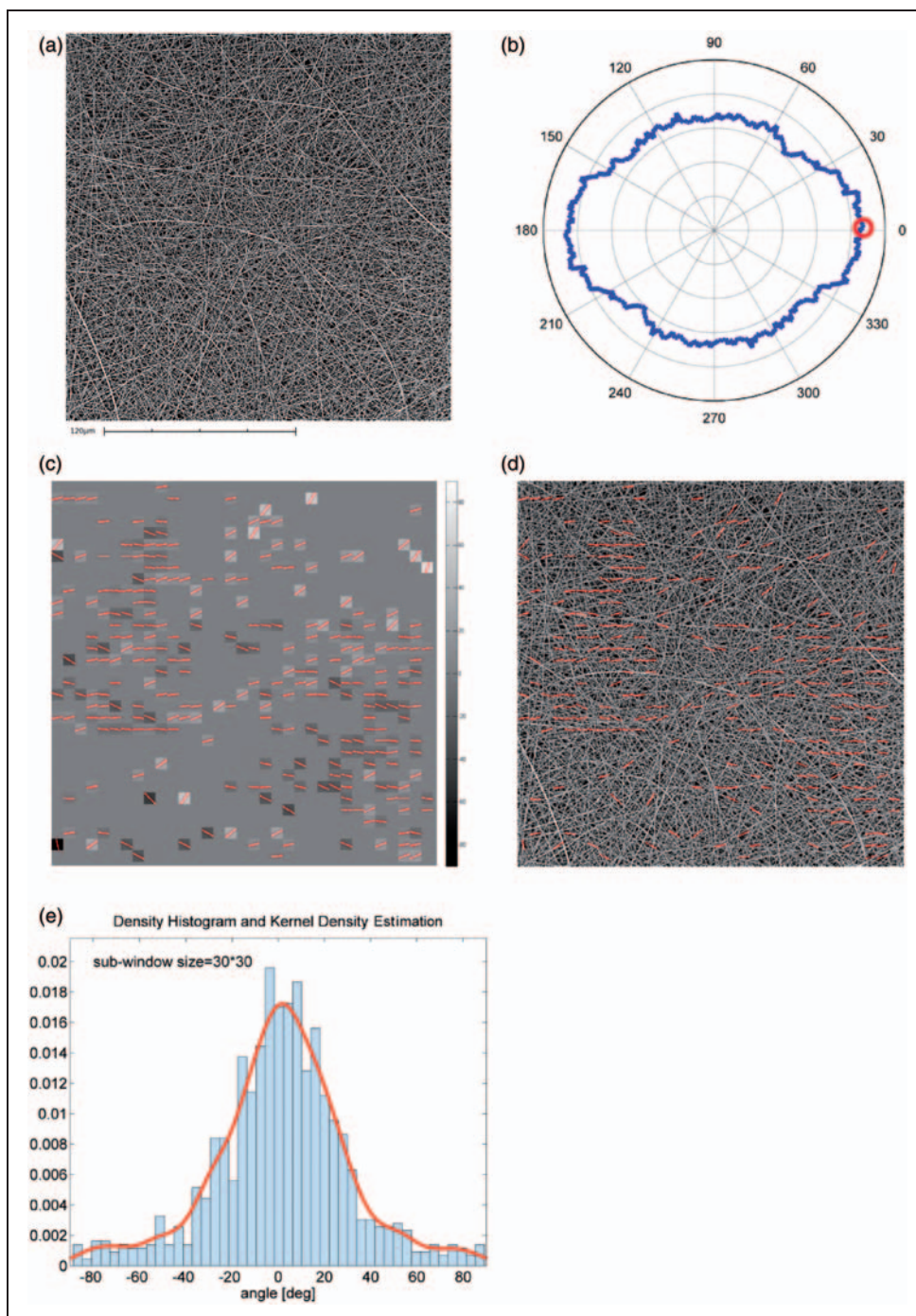


Figure 6. (a) Image of polyvinylalcohol nanofibers (1000×1000 pixels). (b) Estimates of orientation according to Tunak and Linka.²⁷ (c) Gray-level map of orientation (sub-window size 30×30 pixels). (d) Directional vectors in original image. (e) Density histogram and kernel estimates of the density of orientations.

A needleless electrospinning method called Nanospider was used for the PVA polymer. A feeding pump with hypodermic syringe and conductive needle was used for PVDF and PCL polymers.

Images were captured by a Phenom FEI Scanning Electron Microscope and stored as image matrices

in an eight-bit gray-level range. This device is capable of magnifying a specimen from 20 times up to 20,000 times with an image resolution up to 2048×2048 pixels. Matlab software and built-in functions of the Image Processing Toolbox were used for realization of the proposed algorithm; for details see Matlab.³⁰

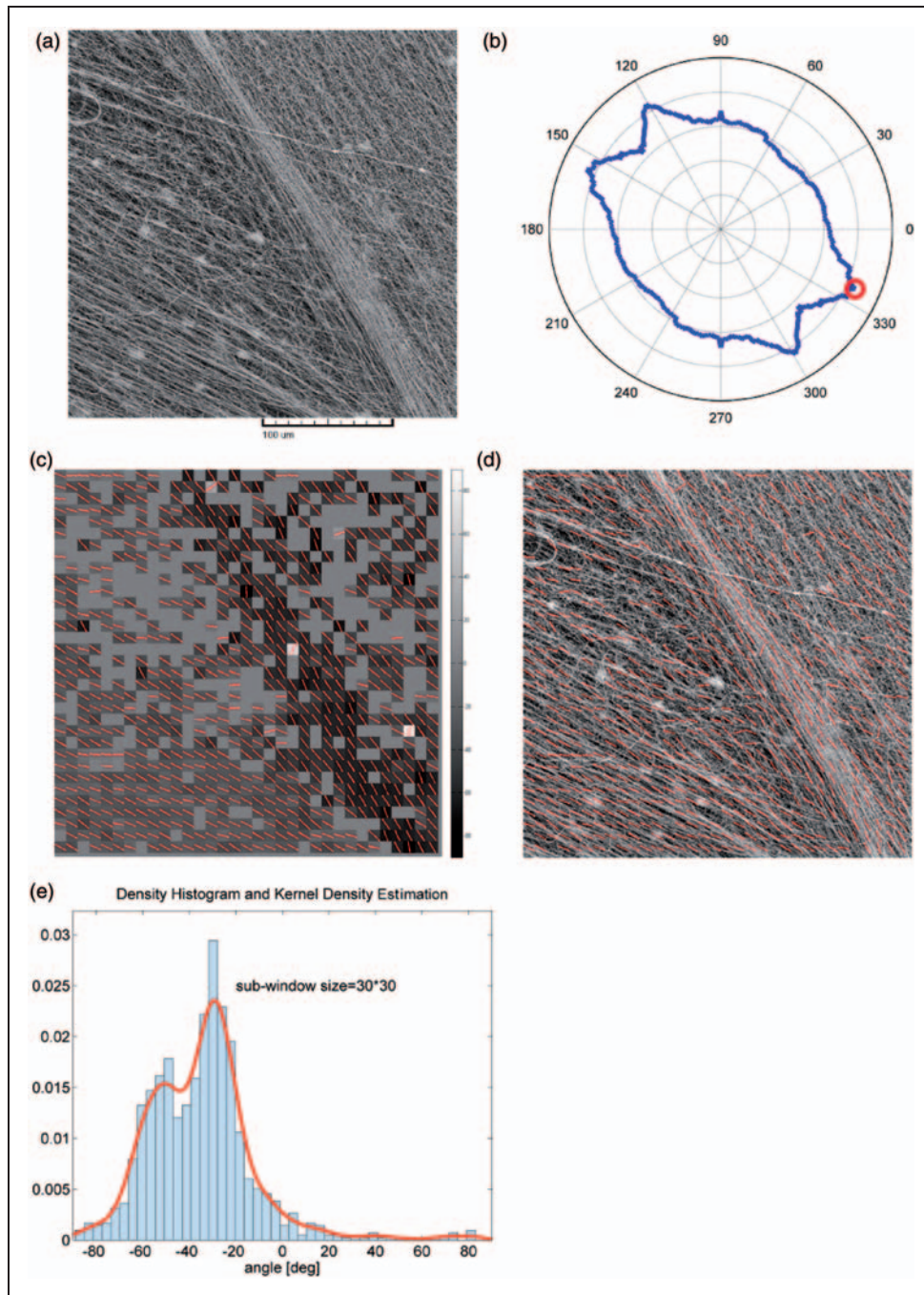


Figure 7. (a) Image of polycaprolactone nanofibers (1000×1000 pixels). (b) Estimates of orientation according to Tunak and Linka.²⁷ (c) Gray-level map of orientation (sub-window size 30×30 pixels). (d) Directional vectors in original image. (e) Density histogram and kernel estimates of the density of orientations.

Examples

To get a taste of the idea, take a look at the results of the proposed approach applied to both simulated and real data. Parameters of tested images are summarized in Table 1.

Example 3.1

First we analyzed a simulated fiber system. Data of the size 800×800 pixels are shown in Figure 11(a). It represents a system of 500 linear fibers randomly oriented in the interval $[0^\circ, 45^\circ]$. The figure was divided into sub-

Table 1. Parameters of tested images

Figure no.	Size of image	Material
1(a1), 11(a)	800 × 800 pix	Simulated system of fibers; length, gray level, and position of fibers was randomly generated from the uniform distribution. Orientation of fibers was randomly generated from the uniform distribution in the interval [0, 45°].
1(a2), 9(a)	500 × 500 pix	Viscose fibers
1(a3)		PVA nanofibers
2(a)	640 × 640 pix	Brodatz texture (D15) ²⁸
3(a)	1000 × 1000 pix	PVDF nanofibers
8(a), 11(a)	1000 × 1000 pix	PCL nanofibers
9(a), 10(a)	1000 × 1000 pix	PVA nanofibers

PVA: polyvinylalcohol; PVDF: polyvinylidene fluoride; PCL: polycaprolactone.

windows of 20×20 pixels. Preferred orientation of objects for every sub-window is represented by the directional vector displayed in red (where the ratio of major-to-minor axis length is greater than 2). Moreover, orientation in degrees is displayed in the gray-level scale. Results of estimating the orientation in the form of a gray-level map can be seen in Figure 11(b). Figure 11(c) displays the directional vector in the original image. Distribution of estimates of the orientations in the respective sub-windows in the form of

density histogram and kernel density estimates are shown in Figure 11(d). We can see that the distribution of orientation of fibers is in very good agreement with the input parameter used for generating the image.

Example 3.2

This example corresponds to the real data comprising oriented viscose fibers. Image size in this case was 500×500 pixels and can be seen in Figure 10(a). We

Algorithm 1. Calculation of the estimate of fiber system orientation

Setup phase

Prepare functions calculating kernel density estimator and histogram from given data (notice that Matlab offers for that purpose functions *KSDENSITY* and *HIST*).
Read data image $f(x, y)$, $x = 0, 1, \dots, M - 1$, $y = 0, 1, \dots, N - 1$.
Set sub-window size $k \times l$ (usually $k = l$).

Split data into $L = \left\lfloor \frac{M}{k} \right\rfloor \times \left\lfloor \frac{N}{l} \right\rfloor$ non-overlapping sub-windows W_1, \dots, W_L . (note: $\lfloor x \rfloor$ means round toward minus infinity)

Main loop (analysis of individual sub-windows W_i)

for $i = 1 : L$ **do**

Calculate Fourier transform $F_i = F_i(u, v)$, $u = 0, 1, \dots, k - 1$, $v = 0, 1, \dots, l - 1$, of W_i

Calculate log transform $Q_i(u, v) = \log(1 + |F_i(u, v)|)$

Calculate threshold $t_i = 0.5 \times \max\{Q_i(u, v)\}$

Prepare new binary image file (in frequency domain) $B_i = B_i(u, v)$, $u = 0, 1, \dots, k - 1$, $v = 0, 1, \dots, l - 1$, using thresholding, i.e.

$$B_i(u, v) = \begin{cases} 0 & \text{if } Q_i(u, v) < t_i \\ 1 & \text{if } Q_i(u, v) \geq t_i \end{cases}$$

Calculate moments of B_i

$$m_{pq} = \sum_u \sum_v u^p v^q B_i(u, v) \quad p, q = 0, 1, 2$$

Calculate central moments of B_i

$$\mu_{pq} = \sum_u \sum_v (u - \bar{u})^p (v - \bar{v})^q B_i(u, v)$$

Calculate corresponding covariance function

$$\text{cov}(B_i) = \begin{pmatrix} \frac{\mu_{20}}{\mu_{00}} & \frac{\mu_{11}}{\mu_{00}} \\ \frac{\mu_{11}}{\mu_{00}} & \frac{\mu_{02}}{\mu_{00}} \end{pmatrix}$$

Calculate eigenvectors of $\text{cov}(B_i)$, i.e.

$$\lambda_j = \frac{\mu_{20} + \mu_{02}}{2} \pm \frac{\sqrt{4\mu_{11}^2 + (\mu_{20} - \mu_{02})^2}}{2} \quad j = 1, 2$$

Calculate orientation (eccentricity) of B_i

$$\theta_i = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{2\mu_{11}}{\mu_{20} - \mu_{02}}\right)$$

and store it

end for

Estimating distribution of directions

Apply kernel density estimator and histogram estimator to the orientations $\theta_1, \dots, \theta_L$ to estimate their distribution (for given image data $f(x, y)$).

Output

Distribution of directions of orientation of individual sub-windows of the global image.

divided the original image into sub-windows of 20×20 pixels. Analogous to the previous example, results of the fiber orientation estimates can be found in Figures 10(b)–(d).

Example 3.3

Results of the analysis of other real data can be found in Figure 3. Figure 3(a) represents an image of the PVDF nanofibers produced via electro-spinning. The size of the image is 1000×1000 pixels. In Figures 3(c) and (d), gray-level maps of the orientation are presented for the sub-windows at 40×40 pixels and 20×20 pixels, respectively, together with the corresponding directional vectors. Figures 3(e) and (f) display directional vectors in the original image and Figures 3(g) and (h) represent distribution of orientation estimates in the form of density histograms and kernel density estimators for the sub-window at sizes of 40×40 pixels and 20×20 pixels, respectively. As can be seen, regions marked by a middle gray level represent regions without preferred orientations. A polar

diagram of an orientation estimate constructed according to Tunak and Linka²⁷ is presented in Figure 3(b). Bimodal density histograms are in accordance with the polar diagram. Moreover, we can see from Figures 3(c) and (d) that the placement of the local maxima (peaks) is practically the same for both sizes of the sub-window. On the other hand, a smaller sub-window size provides smoother results.

Example 3.4

Finally, Figures 4–7 represent several typical situations one can encounter in practice when analyzing images of nanofiber layers produced via electro-spinning. Experiments are described in the *Experimental design: polymers, processing parameters, and image capturing used* section. Let us comment on the obtained results in more detail.

- Figure 4 shows a situation in which one part of the image exhibits a strong orientation of fibers, while the other part corresponds to a more-or-less

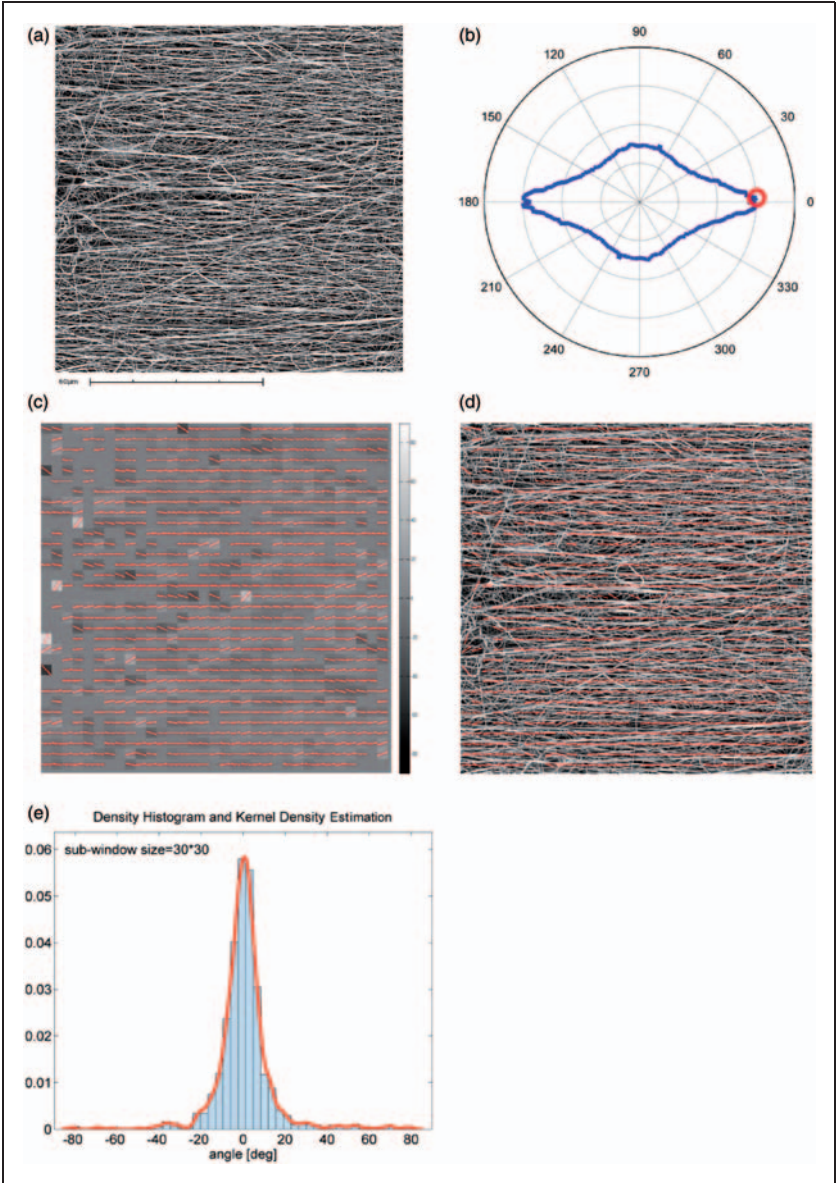


Figure 8. (a) Ellipse. (b) Region of interest.

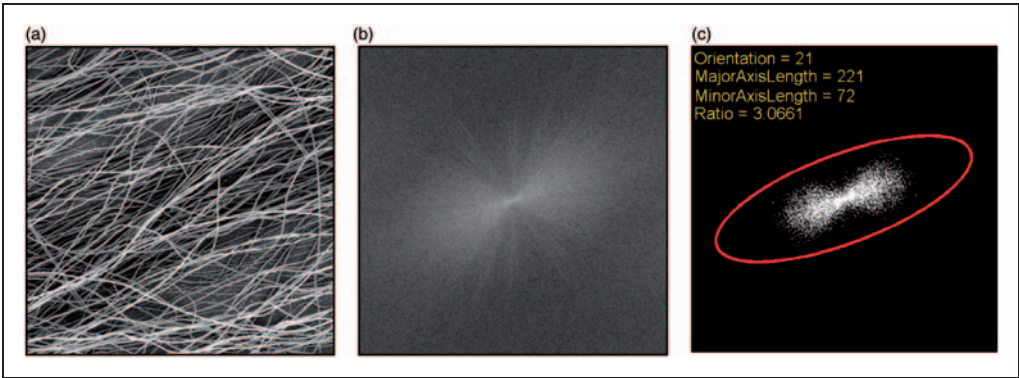


Figure 9. (a) Image of viscose fibers (500×500 pixels). (b) Power spectrum of the image. (c) Estimate of directional orientation using image moments.

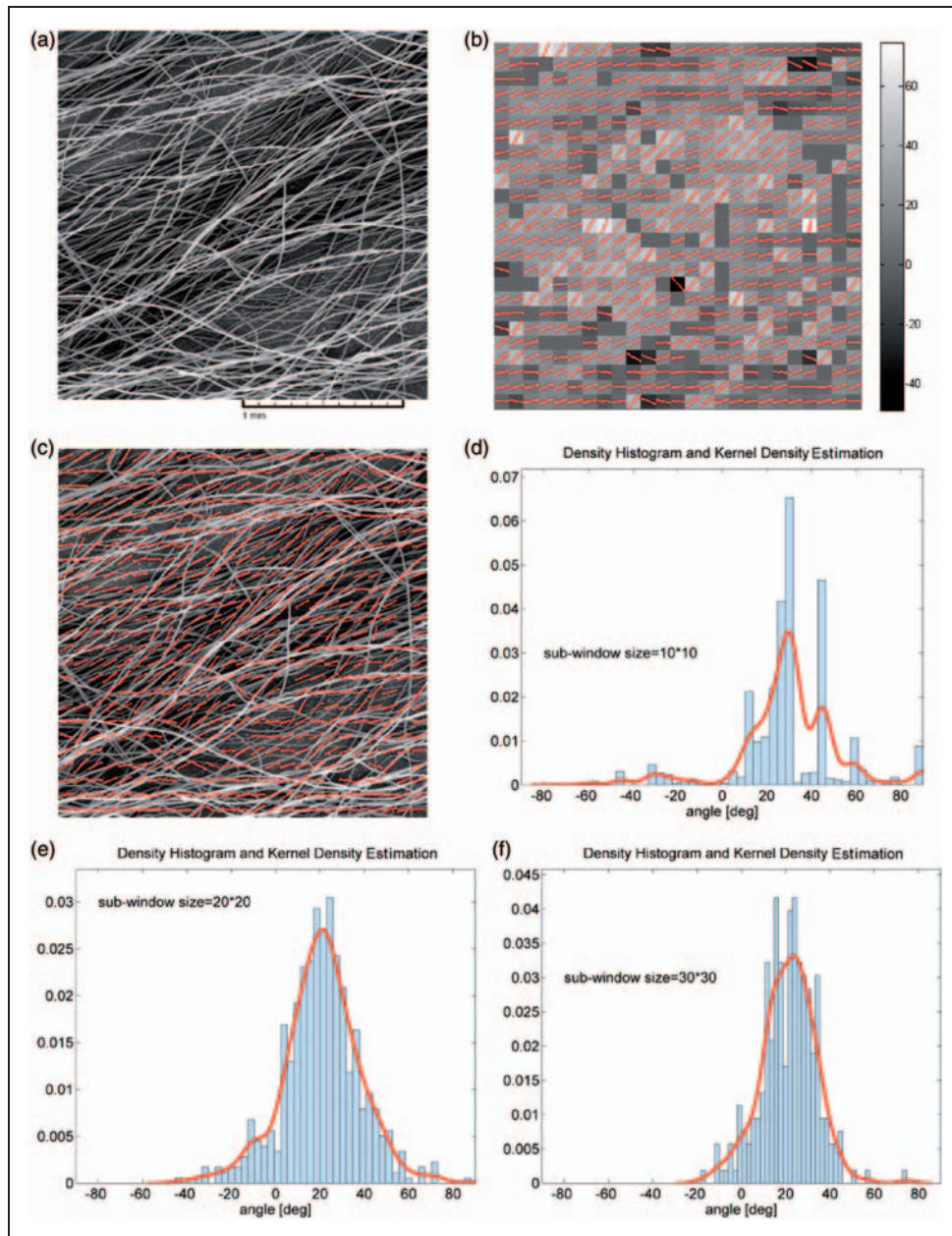


Figure 10. (a) Real fiber system of viscose fibers (500×500 pixels). (b) Gray-level map of orientation (sub-window size 20×20 pixels). (c) Directional vectors in original image. (d) Density histogram and kernel density estimates for sub-window size 10×10 pixels, (e) sub-window size 20×20 pixels, and (f) sub-window size 30×30 pixels.

- anisotropic case. Both histogram and kernel estimates clearly indicate it.
- Figure 5 presents another interesting situation in which seemingly no direction of the fibers appears to dominate the image, at least optically. It reflects the desire of most manufacturers and users, who usually ask for maximum homogeneity in the product. The obtained results, however, show that direction of fibers from the left to the right slightly prevails: compare Figure 5(e).

- Figure 6 displays another typical situation when two directions of fibers with different slopes dominate the image. The two dominating orientations are relatively close to each other and the larger sub-window size allows better discrimination between them.
- Finally, Figure 7 corresponds to a situation with very strong orientation of fibers in only one direction, that is, from the left to the right. We can clearly see that both histogram and kernel estimates

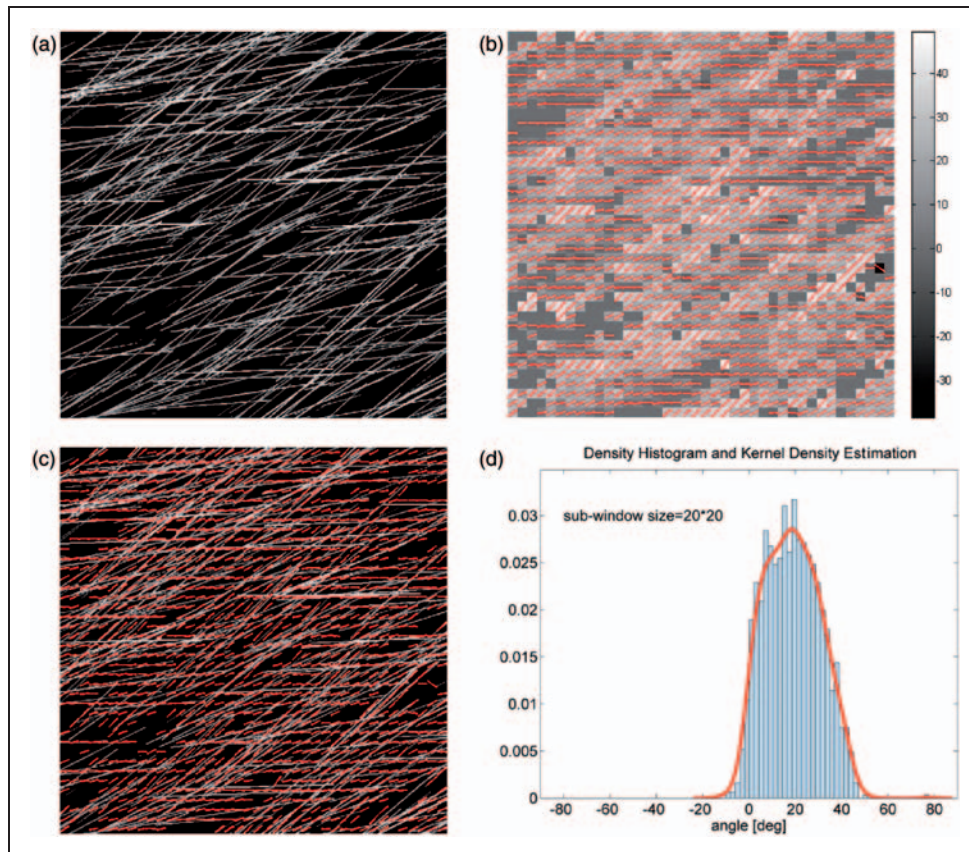


Figure 11. (a) Simulated fiber system (800×800 pixels). (b) Gray-level map of orientations (sub-window size 20×20 pixels). (c) Directional vectors in original image. (d) Histogram and kernel density estimate of the fiber orientation. (Color online only).

Table 2. CPU time needed for the analysis of examples presented in the paper. Different sub-window sizes are considered

Figure no.	Size of the image	Sub-window size	Overall time needed for analysis of the whole image [s]	Number of sub-windows	Time needed for analysis of one sub-window [ms]
5	800×800	20×20	26.8	1600	16.75
6	500×500	10×10	40.3	2500	16.12
		20×20	10.4	625	16.64
		30×30	4.5	256	17.58
7	1000×1000	20×20	41.0	2500	16.40
		40×40	11.1	625	17.76
8	1000×1000	30×30	18.7	1089	17.17
9	1000×1000	30×30	19.1	1089	17.54
10	1000×1000	30×30	19.0	1089	17.45
11	1000×1000	30×30	18.9	1089	17.36

describe the situation very well. Notice that we would get the same results when rotating the original image. Of course, they would be shifted by the angle of rotation.

Moreover, the obtained results clearly demonstrate that the local idea, that is, “divide-and-conquer”, is a very efficient tool, especially when we are trying to describe the orientation of fibers in non-homogeneous

cases when one, two, or a few directions of fibers prevail in the image.

Our approach is schematically described in Algorithm 1. We present only the pseudocode, which can be used in any programming language. Therefore, all technicalities taking into account memory constraints of a given computer, programming language constructions, etc., which may be of key importance for an effective implementation, are missing. Parallelization is not considered.

Table 2 represents computational speed needed for the analysis of examples presented in the paper. We can see that the CPU time needed for the analysis of one sub-window is practically the same regardless of whether its size is 10×10 or 40×40 . Recall that all calculations were carried out using Matlab on a PC computer equipped with Intel Xeon W3530 @ 2.80 GHz, 4.00 GB RAM, and MS Windows 7 Pro 64-bit.

Unfortunately, a decrease in the sub-window size dramatically (in a quadratic way) increases the number of sub-windows and, consequently, the overall time needed for the analysis of the whole image. Nevertheless, there exists at least a partial remedy to this problem, namely, parallelization. We would like to point out that one of the greatest advantages of our method is the fact that it can easily be parallelized using, for example, the so-called CUDA approach. This means that the main processor (CPU) is responsible just for splitting the analyzed image into smaller sub-windows (sub-images) and distributing them to a set of graphical processing units (GPUs) for further analysis. Analysis of each sub-image is identical and follows the procedure given in Algorithm 1. Finally, the results from individual GPUs are collected by the main CPU (“put together”), and further analyzed. We are convinced that the parallelization of calculations is a way of applying our method in real practice for very large dataset as in the quality control of nonwoven materials. For details on CUDA see, for example, CUDA Parallel Computing Platform.³¹

Conclusions

In this paper we concentrated on estimation of fiber orientation of nanofibrous and nonwoven layers. Let us summarize two most important novelties proposed in this paper. Firstly, it turned out that combination of the discrete Fourier transform and results of analysis of the sample image covariance matrix is effective for this purpose. Secondly, the most important point consists of abandoning the currently used “global approach” that characterizes an entire image using just one number (index) and replaces that with the distribution of the fiber orientation in sub-windows of the original

image, the so-called “local approach”. Among the main advantages of this approach are the possibility of describing more precisely fiber orientation of the materials (layers) that exhibit a large anisotropy of the characteristic of interest, for which the characterization by one number (index) as used typically nowadays can be totally misleading.

We devoted our effort to the practically important case of nanofibrous and nonwoven materials, concentrating on the task of monitoring the structure orientation in such systems. However, the results indicate that the suggested method might be used for finding other quantitative characteristics of textile materials as well.

It also appears that the proposed method can be effectively used for estimating the directional orientation of fibrous textile materials from the point of view of their homogeneity, eventual defects, random violation of regularity of the structure, etc.

We think that the methods of the second and third sections are suitable for implementation in software for analysis of fiber orientation, and expect that ongoing research will bring further improvements.

Funding

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant no. 201/09/0755) and TAO/TA, Technology Agency of the Czech Republic (project no. TA03010609).

Acknowledgments

The authors are grateful to all reviewers and editor-in-chief for careful reading and detailed comments and suggestions, which greatly improved the manuscript. Support from the IAP research Network P7/06 is also gratefully acknowledged.

References

1. Tahir MA and Tafreshi HV. Influence of fiber orientation on the transverse permeability of fibrous media. *Phys Fluid* 2009; 21083604/1:5.
2. Maoa N and Russella SJ. Directional permeability in homogeneous nonwoven structures part I: the relationship between directional permeability and fibre orientation. *J Textil Inst* 2000; 91: 235–243.
3. Murugan R and Ramakrishna S. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Eng* 2007; 13: 1845–1866.
4. Pourdeyhimi RB and Davis DH. Measuring fiber orientation in nonwovens part III: Fourier transform. *Textil Res J* 1997; 67: 143–151.
5. Pourdeyhimi B, Dent R, Jerbi A, et al. Measuring fiber orientation in nonwovens, part V: real webs. *Textil Res J* 1999; 69: 185–192.
6. Neckář B and Das D. Modelling of fibre orientation in fibrous materials. *J Textil Inst* 2012; 103: 330–340.
7. Neckář B, Das D and Ishtiaque SM. A mathematical model of fiber orientation in slivers. *J Textil Inst* 2012; 103: 463–476.

8. Tsai DM and Huang TY. Automated surface inspection for directional textures. *Image Vis Comput* 2003; 18: 49–62.
9. Tsai DM and Huang TY. Automated surface inspection for statistical textures. *Image Vis Comput* 2003; 21: 307–323.
10. Kang TJ, Kim CH and Oh KW. Automatic recognition of fabric weave patterns by digital image analysis. *Textil Res J* 1999; 69: 77–83.
11. Wood JE. Applying Fourier and associated transform to pattern characterization in textiles. *Textil Res J* 1990; 60: 212–220.
12. Ravandi SAH and Toriumi K. Fourier transform analysis of plain weave fabric appearance. *Textil Res J* 1995; 65: 676–683.
13. Rataj J and Saxl I. Analysis of planar anisotropy by means of Steiner compact: a simple graphical method. *Acta Stereologica* 1988; 7: 107–112.
14. Rataj J and Saxl I. Analysis of planar anisotropy by means of Steiner compact. *J Appl Probab* 1989; 26: 490–502.
15. Xu B. Identifying fabric structures with fast Fourier transform techniques. *Textil Res J* 1996; 66: 496–506.
16. Escofet J, Millan MS and Rallo M. Modeling of woven fabric structures based on Fourier image analysis. *Appl Optic* 2001; 40: 6170–6176.
17. Jeddi AAA, Kim HS and Pourdeyhimi B. Measurement of fiber orientation in nonwovens: optical Fourier transform. *Int Nonwoven J* 2001; 10: 10–16.
18. Zhang YC, Ding ZR, Wang SY, et al. Discussion of image processing on measuring fiber orientation of nonwoven. *J Textil Res* 2011; 32: 23–27.
19. Josso B, Burton R and Lalor J. Texture orientation and anisotropy calculation by Fourier transform and principal component analysis. *Mech Syst Signal Process* 2005; 19: 1152–1161.
20. Holota R and Nemecek S. Recognition of oriented structures by 2D Fourier transform. *applied electronics* 2002. Pilsen, Czech Republic, 2002.
21. Tonar Z, et al. Microscopic image analysis of elastin network in samples of normal atherosclerotic and aneurismatic abdominal aorta and its biomechanical implications. *J Appl Biomed* 2003; 1: 149–159.
22. Marquez JP. Fourier analysis and automated measurement of cell and fiber angular orientation distribution. *Int J Solid Struct* 2006; 43: 6413–6423.
23. Vahlund CF and Gebart BR. Analysis of an image processing method for fiber orientation in polymer composites. *Polymer Compos* 2001; 22: 327–336.
24. Redon C, Chermant L, Chermant JL, et al. Assessment of fiber orientation in reinforced concrete using Fourier image transform. *J Microsc* 1998; 191: 258–265.
25. Enomae T, Han YH and Isogai A. Nondestructive determination of fiber orientation distribution of fiber surface by image analysis. *Nord Pulp Pap Res J* 2006; 21: 253–259.
26. Gonzales R, Woods RE and Eddins SL. *Digital image processing using MATLAB*. NJ: Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2004.
27. Tunak M and Linka A. Planar anisotropy of fiber system by using 2D Fourier transform. *Fiber Textil East Eur* 2007; 15: 86–90.
28. Brodatz texture. <http://www.ux.uis.no/~tranden/brodatz/D15.gif> (accessed 22 October 2013).
29. Scott DW. *Multivariate density estimation: Theory, practice, and visualization*, 2nd ed, New York: J. Wiley, 2006.
30. Matlab, The Language of Scientific Computing, <http://www.mathworks.com/products/matlab/> (accessed 22 October 2013).
31. CUDA Parallel Computing Platform. http://www.nvidia.com/object/cuda_home_new.html (accessed 22 October 2013).

D02G 3/36 (2006.01)
D04H 1/728 (2012.01)
D01H 4/28 (2006.01)
D02G 1/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

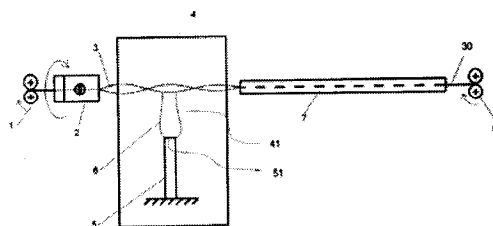
(21) Číslo přihlášky: **2015-382**
 (22) Přihlášeno: **05.06.2015**
 (40) Zveřejněno: **18.01.2017**
(Věstník č. 3/2017)
 (47) Uděleno: **07.12.2016**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **18.01.2017**
(Věstník č. 3/2017)

(56) Relevantní dokumenty:

CN 104032423 A; JP 4922237B B; JP 4922144B B; CZ 305133 B; CZ 305039 B; CN 104345047 A; CN 104195700 A.

- (73) Majitel patentu:
Technická univerzita v Liberci, Liberec, CZ
- (72) Původce:
 prof. Ing. Jaroslav Beran, CSc., Liberec, CZ
 Ing. Jan Valtera, Ph.D., Liberec 1, CZ
 doc. Ing. Martin Bílek, Ph.D., Liberec 1, CZ
 Bc. Ondřej Bařka, Liberec 1, CZ
 Ing. Josef Skřivánek, Frydlant v Čechách, CZ
 Ing. Petr Žabka, Ph.D., Liberec 12, CZ
 Ing. Jiří Komárek, Jablonec nad Nisou, CZ
 prof. RNDr. David Lukáš, CSc., Liberec 6, CZ
 Ing. Pavel Pokorný, Ph.D., Frydlant v Čechách, CZ
 doc. Ing. Eva Kuželová-Košťáková, Ph.D., Turnov, CZ
 Ing. Petr Mikeš, Ph.D., Mníšek u Liberce, CZ
 Ing. Jiří Chvojka, Ph.D., Liberec 2, CZ
 Ing. Tomáš Kalous, Liberec 30, CZ
 Bc. Filip Sanetrník, Liberec 1, CZ
- (74) Zástupce:
 Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
 Dobroslav Musil, Zábrdovická 11, 615 00 Brno

je kolem jádra (31) ovínut v pásu ve tvaru šroubovice. Při způsobu výroby lineárního vláknenného útvaru se na zvlákňovací elektrodě (5) napájené střídavým napětím vytváří nanovláknenná vlečka (6), která se ve zvlákňovacím prostoru (41) mění na plochý pás s uspořádanou strukturou nanovláken, který se přivádí k obvodu nosného lineárního útvaru (3) rotujícího ve zvlákňovacím prostoru (41) kolem vlastní osy a/nebo balonujícího ve zvlákňovacím prostoru (41) s alespoň jednou kmitnou. Pás vytvořený z nanovláknenné vlečky (6) se kolem lineárního nosného útvaru (3) ovívá a kolem nosného lineárního útvaru (3) vytváří šroubovici. Zařízení k výrobě lineárního vláknenného útvaru obsahuje podávací ústrojí (1) nosného lineárního útvaru (3) do zvlákňovací komory (4), v níž je uspořádána alespoň jedna zvlákňovací elektroda (5), odtahové zařízení (8) a sušicí a fixační zařízení (7).



- (54) Název vynálezu:
**Lineární vláknenný útvar s pláštěm z
 polymerních nanovláken obalujícím nosný
 lineární útvar tvořící jádro, způsob a
 zařízení k jeho výrobě**

- (57) Anotace:
 Lineární vláknenný útvar s nanovláknenným pláštěm obsahuje jádro tvořené nosným lineárním útvarem (3) a polymerní nanovláknna. Polymerní nanovláknna obalují nosný lineární útvar (3) tvořící jádro (31) výsledného lineárního vláknenného útvaru (30) nanovláknenným pláštěm (32) tvořeným plochým útvarem vytvořeným z nanovláknenné vlečky (6) s uspořádanou strukturou nanovláken vznikající při zvlákňování střídavým vysokým elektrickým napětím. Nanovláknenný plášť (32)

Lineární vlákenný útvar s pláštěm z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar tvořící jádro, způsob a zařízení k jeho výrobě

5 Oblast techniky

Vynález se týká lineárního vlákenného útvaru s pláštěm z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar tvořící jádro.

- 10 Dále se vynález týká způsobu výroby lineárního vlákenného útvaru s pláštěm z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar tvořící jádro ve zvlákňovací komoře, v níž je uspořádána zvlákňovací elektroda napájená střídavým vysokým napětím.

- 15 Vynález se rovněž týká zařízení k výrobě lineárního vlákenného útvaru, obsahujícího podávací ústrojí nosného lineárního útvaru do zvlákňovací komory, v níž je uspořádána zvlákňovací elektroda připojená ke zdroji střídavého elektrického napětí k vytváření nanovlákně vlečky směrem k dráze lineárního nosného útvaru a odtahové zařízení výsledného lineárního vlákenného útvaru tvořeného nosným lineárním útwarem s pláštěm z polymerních nanovláken ze zvlákňovací komory.

20

Dosavadní stav techniky

- 25 Dosud známé lineární vlákenné útvary obsahující jádro tvořené nosným lineárním textilním vlákenným útwarem a na jádru vytvořeným pláštěm z nanovláken jsou vyráběny technologií elektrostatického zvlákňování, tedy zvlákňování účinkem stejnosměrného napětí vytvořeného rozdílem potenciálů mezi dvěma elektrodami.

- 30 CZ PV 2007-179 popisuje lineární vlákenný útvar obsahující polymerní nanovlákná, která vytvářejí plášť na povrchu jádra tvořeného nosným lineárním vlákenným útwarem, přičemž alespoň některá nanovlákná jsou zachycena mezi vlákny povrchové části tohoto jádra. Nanovlákná se vyrábějí elektrostatickým zvlákňováním (tj. pomocí stejnosměrných zdrojů vysokého elektrického napětí), přičemž zvlákňovacím prostorem mezi zvlákňovací elektrodou a sběrnou elektrodou se vede nosný lineární útvar, jemuž se mimo zvlákňovací prostor uděluje nepravý zákrut.
- 35 Proto nosný lineární útvar ve zvlákňovacím prostoru rotuje kolem své osy a na jeho povrchu se ukládají jednotlivá nanovlákná unášená zvlákňovacím prostorem ke sběrné elektrodě. Ne všechna nanovlákná se zachytí na nosném lineárním útvaru, ale část jich proletí mimo, a zachytí se až na sběrné elektrodě. Tento problém se nepodařilo odstranit ani provedením, v němž je sběrná elektroda tvořena vodivým nosným lineárním útwarem. I u tohoto provedení velká část nanovláken proletí kolem lineárního nosného útvaru a zachycuje se na stěnách zvlákňovacího prostoru.
- 40

- 45 Přestože jsou nanovlákná zachycena mezi vlákny povrchové části jádra, dochází při jejich odvíjení k odtrhávání nanovlákněného pláště od jádra v důsledku sil působících mezi povrchy sousedních vláken v návíně, které jsou větší nežli soudržná síla mezi pláštěm nanovláken a jádrem.

- Výše uvedené problémy se podařilo částečně vyřešit podle CZ PV 2009-797, u něhož jsou nanovlákná k jádru fixována ovinem alespoň jednou krycí nití. Ovin krycí nití zajišťuje pro většinu možných aplikací dostatečně pevné a odolné uložení nanovláken na jádru a současně umožňuje
- 50 plné využití specifických vlastností nanovláken, neboť nebrání v přístupu k nim. Vlastní vlákenný útvar se vyrábí několikanásobným průchodem nosného lineárního útvaru zvlákňovacím prostorem, při němž je nosný lineární útvar mimo zvlákňovací prostor vrácen přes část obvodu alespoň jednoho válce, na který nabíhá šikmo, takže po vrácení se nosný lineární útvar obrátí ke zvlákňovací elektrodě opačnou stranou. U tohoto provedení nedochází k nepravému zákrutu,
- 55 takže při průchodu zvlákňovacím prostorem nosný lineární útvar nerotuje kolem své osy, takže

nanovlákná se ukládají při každém průchodu na tu stranu nosného lineárního útvaru, která je přivrácená ke zvlákňovací elektrodě. Vzhledem k několikanásobnému průchodu nosného lineárního útvaru zvlákňovacím prostorem, uloží se na něm větší množství nanovláken, než u předchozího řešení, přesto však část nanovláken proletí až ke sběrné elektrodě. Nanovlákná se na povrch nosného lineárního útvaru ukládají neuspořádaně jako samostatná nanovlákná do vrstev a jejich soudržnost s povrchem jádra je malá. Upevnění nanovláken na povrchu nosného lineárního útvaru se dosáhne následným ovinutím alespoň jednou krycí nití.

US 8 163 227 popisuje zařízení, které je schopno produkovat vysoce pevnou a stejnoměrnou přízi vyrobenou částečně z nanovláken. Nanovlákná se vyrábějí metodou elektrostatického zvlákňování, s vysokou produktivitou a při nízkých nákladech. Zařízení podle tohoto vynálezu využívá depozici nanovláken spředených z tryskové zvlákňovací elektrody, které jsou jí produkovány téměř stejnoměrně. Nanovlákná jsou k niti procházející centrem kruhové zvlákňovací elektrody přitahována jako ke kolektorů, protože je tato nit elektricky nabitá tak, že nanovlákná přitahuje. Tento způsob používá pro tvorbu vláken stejnosměrného, tzv. elektrostatického, zvlákňování. Střídavých zdrojů napětí se zde používá v některých variantách realizace na kolektoru za účelem vytvoření tzv. „rotujícího elektrického pole“, které má za úkol podpořit vytvoření šroubovice nanovláken na jádru příze. Je vysoce nepravděpodobné, že je zařízení podle uvedeného způsobu schopné dlouhodobé produkce nanovláknenné jádrové příze z následujících důvodů:

(1) Způsob vyžaduje změnu směru letu nanovláken z horizontálního do vertikálního. Toho nelze dosáhnout tím, že nanovlákná budou sledovat siločáry, jak naznačují obrázky i text patentu. Důvodem je to, že nanovlákná při svém vzniku silně bíčí ve zvlákňovacím prostoru, a proto ze směru siločar značně vybočují. Je pravděpodobnější, že by se nanovlákná přednostně usazovala na kolektorech a nikoliv na nabízeném jádru příze.

(2) Je nepravděpodobné, že by nanovlákná pohybující se ve zvlákňovacím prostoru rychlostí 3 až 10 m/s byla na své dráze významně ovlivněna rotačním pohybem zvlákňovací elektrody nebo kolektoru o obvodových rychlostech nižších.

(3) Vysoké rychlosti obvodové rychlosti zvlákňovací elektrody nebo kolektoru by však způsobovaly silné odstředivé síly působící i na Taylorovy kužely na výustkách kapilár zvlákňovací elektrody. Polymerní roztok by tak byl nekontrolovatelně radiálně rozstříkáván.

V případě, že by se přízi podařilo vyrobit, bude mít podobné nevýhody jako výše popsany lineární vláknenný útvar podle CZ PV 2007-179.

Cílem vynálezu je vytvořit lineární vláknenný útvar obsahující jádro a polymerní nanovlákná, u něhož by bylo zaručeno pevné spojení jádra s nanovláknenným pláštěm bez nutnosti ovíjení krycí nití a zároveň zaručena vzájemná netečnost povrchů takových lineárních vláknenných útvarů při odvíjení z návinu na cívce, kde byl před tím uložen v množství ovinů vedle sebe a množství vrstev těchto ovinů nad sebou. Současně je cílem vynálezu navrhnout způsob výroby takového útvaru a vytvořit zařízení k jeho výrobě.

Podstata vynálezu

Cíle vynálezu je dosaženo vytvořením lineárního vláknenného útvaru podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že plášť z polymerních nanovláken je tvořen plochým pásem s uspořádanou nanovláknennou strukturou vytvořeným z nanovláknenné vlečky vznikající nad zvlákňovací elektrodou při zvlákňování střídavým vysokým elektrickým napětím, který je kolem jádra ovinuta ve tvaru šroubovice. Dutá vlečka nanovláken, vytvořená při zvlákňování střídavým napětím, představuje již před svým složením do plochého útvaru, který na jádru vytváří při ovíjení šroubovici, elektricky neutrální útvar tvořený polymerními nanovláknny uspořádanými do nepravidelné mřížkové struktury. V důsledku své elektrické neutrality je vlečka nanovláken i po svém složení do plochého útvaru a ovinutí kolem jádra v pásu ve tvaru šroubovice elektricky neutrální a povrch

vytvořeného lineárního útvaru je neutrální i vůči všem sousedním ovinům v návinnu na cívce, takže výsledný lineární vláknenný útvar lze bez problémů odvíjet z návinnu na cívce a zpracovávat následnými textilními technologiemi.

- 5 Plášť z polymerních nanovláken může po odstranění jádra z výsledného lineárního vláknenného útvaru vytvořit dutý trubicový útvar, který může sloužit například jako nanovláknenná cévní náhrada vhodného průměru.

10 Podstata způsobu výroby lineárního vláknenného útvaru podle vynálezu spočívá v tom, že vlečka nanovláken vytvářená na zvlákňovací elektrodě napájené střídavým napětím se ve zvlákňovacím prostoru mění na plochý pás s uspořádanou strukturou nanovláken, který se přivádí k obvodu nosného lineárního útvaru rotujícího ve zvlákňovacím prostoru kolem vlastní osy a/nebo ve tvaru balonu s alespoň jednou kmitnou, přičemž pás vytvořený z nanovláknenné vlečky se kolem nosného lineárního útvaru ovíjí a kolem nosného lineárního útvaru vytváří šroubovici.

15 Výhody tohoto způsobu výroby jádrové nanopříze spočívají ve vytváření relativně silného/tlustého nanovláknenného ovinu při relativně vysoké produkční rychlosti jádrové příze kolem 60 m/min. Úlety nanovláken mimo ovin jsou přitom minimální.

20 Podstata zařízení k výrobě lineárního vláknenného útvaru podle vynálezu spočívá v tom, že v dráze nosného lineárního útvaru je uspořádáno zákrutové zařízení schopné vytvářet na nosném lineárním útvaru ve zvlákňovací komoře balon nebo alespoň nepravý zákrut, přičemž v důsledku balonování a/nebo rotace nosného lineárního útvaru se nanovláknenná vlečka ve formě plochého pásu s uspořádanou strukturou nanovláken ovíjí kolem nosného lineárního útvaru.

25 Za zvlákňovací komorou je v dráze nosného lineárního útvaru uspořádáno sušicí a fixační zařízení k sušení a fixaci pásu s uspořádanou nanovláknennou strukturou vytvořeného z nanovláknenné vlečky a ovinutého kolem nosného lineárního útvaru ve šroubovici. Po usušení a fixaci pásu nanovláken na nosném lineárním útvaru je výsledný lineární vláknenný útvar schopen dalšího
30 zpracování běžnými textilními technologiemi, například pletením.

Objasnění výkresů

35 Další výhody a význaky způsobu a zařízení podle vynálezu vyplývají z přiložených výkresů, kde jsou na obr. 1, obr. 2 a obr. 4 schematicky znázorněny příkladné varianty zařízení pro provádění způsobu pro výrobu lineárního vláknenného útvaru podle vynálezu a princip tohoto způsobu, na Obr. 3 je znázorněn princip balonování nebo rotace nosného lineárního útvaru (hedvábí, staplová příze, monofil) pomocí zákrutového zařízení s „pinolou“ neboli se zákrutovou trubicí.

40 Lineární vláknenný útvar podle vynálezu je znázorněn na obr. 5a, 5b, 5c a 5d při různých zvětšeních skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), na obr. 6 je SEM snímek příčného řezu lineárním vláknenným útvarem podle vynálezu s pláštěm z polymerních nanovláken a s nosným lineárním útvarem tvořeným polyesterovou přízí, na obr. 7A je SEM snímek příčného řezu
45 lineárním vláknenným útvarem podle vynálezu s nosným lineárním útvarem tvořeným monofilem, obr. 7B SEM snímek příčného řezu lineárního vláknenného útvaru s jádrem tvořeným přízí a pláštěm z nanovláken a příčný řez nanovláknennou trubicí vzniklou po vyjmutí jádra, obr. 8A, B detailní zobrazení příčného řezu nanovláknennou trubicí vzniklou po odstranění jádra.

Příklady uskutečnění vynálezu

50 V příkladném provedení podle obr. 1 jsou ve směru pohybu nosného lineárního útvaru 3 za sebou uspořádány podávací ústrojí 1, sloužící k odvíjení nosného lineárního útvaru 3 známým způsobem z neznázorněné předlohy, zákrutové zařízení 2, schopné vytvářet na nosném lineárním útva-
55

ru 3 balon s alespoň jednou kmitnou nebo alespoň nepravý zákrut, a zvlákňovací komora 4. Za zvlákňovací komorou 4 je uspořádáno sušicí a fixační zařízení 7 pro sušení a fixaci nanovláknenného pláště 32, s výhodou ve tvaru trubice nebo kanálu, a odtahové zařízení 8, za nímž je stabilizovaný výsledný lineární vlákenný útvar 30 s nanovláknenným pláštěm 32 podle vynálezu některým ze známých způsobů navíjen na neznázorněnou cívku. Nebo může být odtah výsledného lineárního útvaru realizován přímo navíjecím ústrojím.

Zvlákňování probíhá účinkem střídavého napětí podle CZ 304 137.

Ve zvlákňovací komoře 4 je uspořádána zvlákňovací elektroda 5, která je připojena k neznázorněnému regulovatelnému zdroji střídavého vysokého napětí, například o napětí 35 kV a frekvenci 50 Hz, a k neznázorněnému přívodu polymerního roztoku pro zvlákňování, do něhož je polymer-
ní roztok dávkován, například pomocí neznázorněné lineární pumpy. V okolí čela 51 zvlákňovací
elektrody 5 a nad ní se ve zvlákňovací komoře 4 nachází zvlákňovací prostor 41. Po přivedení
zvlákňovaného polymeru na čelo 51 zvlákňovací elektrody 5 se při zvlákňování střídavým napě-
tím začnou vytvářet nanovláknna po obvodu čela 51 a směrem vzhůru stoupá dutý prostorový
nanovláknenný útvar o velmi nízké specifické hmotnosti, nazývaný nanovláknenná vlečka 6, která
je účinkem elektrického větru unášena směrem od zvlákňovací elektrody 5 ve směru gradientu
vytvářených elektrických polí k balonujícímu lineárnímu nosnému útvaru 3, který protíná dráhu
nanovláknenné vlečky 6 a tvoří jádro 31 výsledného lineárního vlákenného útvaru 30, v případě
potřeby se účinku elektrického větru pomáhá prouděním vzduchu potřebným směrem. Nano-
vláknenná vlečka 6 je elektricky neutrální, neboť během jejího pohybu zvlákňovacím prostorem
41 dochází ke vzájemné rekombinaci opačných elektrických nábojů jednotlivých nanovláken
nebo jejich úseků. Polymerní nanovláknna jsou v nanovláknenné vlečce 6 uspořádána do nepravi-
delné mřížkové struktury, ve které jednotlivá nanovláknna v krátkých úsecích mění svůj směr.

Jak je znázorněno na obr. 3, nosný lineární útvar 3 v důsledku rotace excentrického prostředku 23
zákrutového zařízení 2, jímž prochází, například otvoru umístěného mimo osu rotace zákrutové-
ho zařízení 2, vytváří balón o několika kmitnách procházejících zvlákňovací komorou 4 a ve
zvlákňovacím prostoru 41 se na povrch nosného lineárního útvaru 3 rotujícího v balónu ukládá
nanovláknenná vlečka 6, unášena do tohoto prostoru účinkem elektrického větru, která se kolem
nosného lineárního útvaru 3 ovíjí, přičemž se skládá do tvaru pásu, tedy do plochého útvaru
vytvořeného z nanovláknenné vlečky 6, který se při balonování ovíjí kolem jádra 31 tvořeného
nosným lineárním útwarem 3 a vytváří na něm nanovláknenný plášť 32 tvořený oviny ve tvaru
šroubovice. Kmitny balónu jsou znázorněny na obr. 1, 3 a 4, přičemž na obr. 3 je znázorněno
zákrutové zařízení a kmitny nosného lineárního útvaru 3 tvořícího jádro 31 výsledného lineárního
vlákenného útvaru ve zvlákňovací komoře. Nosný lineární útvar 3 je podáván z neznázorněné
předlohy podávacím ústrojím 1 s definovaným předpětím. Zákrutové zařízení 2 je v příkladném
provedení opatřeno vstupním otvorem 20, který je umístěn v jeho ose 22 rotace. Ze vstupního
otvoru 20 je nosný lineární útvar 3 veden přes kolík 21 do excentrického členu 23, který je ve
znázorněném provedení tvořen axiálním otvorem uspořádaným mimo osu 22 rotace zákrutového
zařízení 2. Rotací zákrutového zařízení 2 dochází k balonování nosného lineárního útvaru 3, na
který se ve zvlákňovací komoře 4 ukládá nanovláknenná vlečka 6 ve tvaru pásu.

Pokud je rychlost ovíjení nanovláknenné vlečky 6 stejná jako rychlost jejího vytváření, zůstává
uspořádání nanovláken v nanovláknenné vlečce 6 stejné i po jejím ovinutí kolem jádra, jak je vidět
i na plášti 32 výsledného lineárního vlákenného útvaru 30, znázorněného na obr. 5a – d. Je-li
rychlost ovíjení nanovláknenné vlečky 6 větší než je rychlost jejího vytváření, dochází ke dlužení
nanovláknenné vlečky 6, a v důsledku toho může dojít i k určité orientaci nanovláken ve struktuře
nanovláknenné vlečky 6 po jejím navinutí na jádro 31.

Ze zvlákňovací komory 4 je vyráběný výsledný lineární vlákenný útvar 30 s nanovláknenným
pláštěm 32 odtahován odtahovým zařízením 8 přes sušicí a fixační zařízení 7, v němž se nano-
vláknenný plášť 32 vysouší a fixuje při teplotě (například 60 až 250 °C) odpovídající druhu zvlák-
ňovaného polymeru a materiálu nosného lineárního útvaru 3. Výsledný lineární vlákenný útvar

30 s nanovlákným pláštěm 32, obvykle nazývaný nanovlákná jádrová příze, se za odtahovým zařízením 8 známým způsobem navíjí na neznázorněnou cívku.

Při sérii ověřovacích pokusů se na zvlákňovací elektrodu 5 přivádělo střídavé vysoké napětí o hodnotě ± 36 kV, s frekvencí 50 Hz. Jako jádro byl použit polyesterový multifil o jemnosti 150 Tex. Zákrutové zařízení 2 rotovalo s frekvencí 5000 až 20 000 otáček za minutu a rychlost odtahu byla nastavena na 10 až 60 metrů za minutu. Použitými zvlákňovanými materiály byl roztok Polyvinyl butyralu (PVB) nebo polyakrylonitrilu (PAN). Dávkování zvlákňovací elektrody bylo nastaveno v rozmezí 80 až 250 mililitrů za hodinu. Pro jádrovou přízi PVB se hodnoty průměrů vláken pohybovaly v rozmezí 682 ± 280 nm. Při zvlákňování roztoků PAN byla naměřena střední hodnota průměru vláken 1805 nm s velkou hodnotou směrodatné odchylky ± 1322 nm a tudíž s významným podílem nanovláken.

V příkladu provedení podle obr. 2 je uspořádání zařízení velmi podobné obr. 1, pouze zákrutové zařízení 2 je uspořádáno mezi sušicím a fixačním zařízením 7 a odtahovým zařízením 8. U tohoto provedení dochází při rotaci zákrutového zařízení 2 k vytváření nepravého zákrutu na nosném lineárním útvaru 3 a výsledném lineárním vlákněném útvaru 31 mezi zákrutovým zařízením 2 a podávacím ústrojím 1. Vzhledem k umístění zákrutového zařízení 2 balonování ve zvlákňovací komoře 4 nevzniká nebo jsou jeho kmitny velmi malé. Ve zvlákňovací komoře 4 tedy nosný vlákněný útvar 3 rotuje kolem své osy a nanovlákná vlečka 6, jejíž dráhu nosný vlákněný útvar 3 protíná, se na něj navíjí ve tvaru pásu, který na jádru 31 vytváří vrstvu ve tvaru šroubovice. Balonování se u tohoto provedení dá dosáhnout pulzním foukáním proudu vzduchu na mechanicky roztočený nosný lineární útvar.

V příkladu provedení podle obr. 4 jsou použita dvě zákrutová zařízení 2, z nichž první je umístěno před zvlákňovací komorou 4, jako v příkladu 1, a zajišťuje balonování nosného lineárního útvaru 3 ve zvlákňovací komoře 4 a druhé zákrutové zařízení 2 je umístěno za sušicím a fixačním zařízením 7, jako v příkladu 2, a udílí procházejícímu výslednému lineárnímu vlákněnému útvaru 30 nepravý zákrut, který se přenáší až do nosného lineárního útvaru 3, tvořícího jádro 31.

Otáčky druhého zákrutového zařízení 2 realizují nepravý zákrut. Je třeba vzít v úvahu, že skutečné otáčky realizující nepravý zákrut jsou nižší než otáčky druhého zákrutového zařízení 2, protože místo čistého valení zakrucovaného výsledného lineárního vlákněného útvaru 30 dochází při překročení třecích sil v axiálním otvoru ke smýkání a ke ztrátě na zákrutech. Pokud jsou otáčky druhého zákrutového zařízení 2 větší než otáčky prvního zákrutového zařízení 2, dojde při ovíjení nanovlákněné vlečky 6 na nosný lineární útvar 3 tvořící jádro 31 k přikroucení nanovlákněného pásu v důsledku nepravého zákrutu, čímž se zlepši pevnost spojení nanovlákněného pláště 32 a jádra 31 ve výsledném lineárním vlákněném útvaru 30, což bylo experimentálně ověřeno. Po průchodu sušicím a fixačním zařízením 7 se nanovlákněný plášť zřejmě po anulaci nepravého zákrutu za druhým zákrutovým zařízením 2 fixuje na jádru.

V případě požadavku na nanovlákněný plášť 32 tvořený dvěma nebo více vrstvami nanovláken se jeví výhodné umístit do zvlákňovací komory 4 dvě nebo více zvlákňovacích elektrod 5 za sebou, takže se z první zvlákňovací elektrody 5 ukládá první plochý útvar vytvořený z duté nanovlákněné vlečky 6 na nosný lineární útvar 3 při jeho balonování a/nebo zakrucování nepravým zákrutem a vytvoří tak první nanovlákněnou vrstvu. Následně se z druhé zvlákňovací elektrody 5 stejným způsobem ukládá na první vrstvu nanovláken druhý plochý útvar vytvořený z duté nanovlákněné vlečky 6. Případně se na druhou vrstvu nanovláken ukládá další plochý útvar vytvořený z duté nanovlákněné vlečky 6 vytvářené další zvlákňovací elektrodou 5. Jednotlivé vrstvy nanovlákněného pláště mohou být vytvořeny z materiálů s odlišnými vlastnostmi. Například první vrstva obalující nosný lineární útvar 3 tvořící jádro 31 výsledného nanovlákněného útvaru 30 je vytvořena z adhezního materiálu nebo z materiálu teplem smrštitelného, například PVB nebo polykaploaktonu (PCL). Ve výhodném provedení je vnější nanovlákněná vrstva nanovlákněného pláště 32 vytvořena z krycího materiálu schopného chránit vnitřní vrstvy před poškozením, například z polyvinylidenfluoridu (PVDF) nebo polyuretanu (PU).

Vícevrstvý nanovlákný plášť 32 lze vyrobit také opakovaným nanášením další vrstvy na vrstvu předcházející, přičemž každá vrstva je po nanesení sušena a fixována.

Pevným a těsným ovinem jádrové příze vhodné tloušťky/jemnosti, nebo monofilu vhodného průměru, nebo pevného jádra z jiného materiálu vhodného tvaru a průřezu vznikne výsledný lineární útvar 30 s nanovlákným pláštěm 32, znázorněný na obr. 6 a 7, ze kterého se vytažením, rozpouštěním, vyplavením, nebo jiným vhodným způsobem nosné jádro vyjme. Zachovaný nanovlákný plášť 32, který pokrýval jádro 31, vytvoří trubicový útvar znázorněný na obr. 7 a 8, který může sloužit například jako nanovlákná cévní náhrada vhodného průměru.

Vytváření trubicového útvaru lze provádět kontinuálním nebo diskontinuálním způsobem podle potřeby. Pro výrobu trubicového útvaru lze s výhodou použít zařízení a způsob podle obr. 1 nebo 4.

Průmyslová využitelnost

Lineární vlákný útvar podle vynálezu lze zpracovávat jako jádrové příze následnými textilními technologiemi do plošných nebo trojrozměrných textilních útvarů, nebo z nich po odstranění jádra vytvářet duté nanovlákné trubicové útvary.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Lineární vlákný útvar s pláštěm (32) z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar (3) tvořící jádro (31), **vyznačující se tím**, že plášť (32) z polymerních nanovláken je tvořen plochým pásem s uspořádanou strukturou nanovláken vytvořeným z nanovlákné vlečky (6) vznikající nad zvlákňovací elektrodou (5) při zvlákňování střídavým vysokým elektrickým napětím, který je kolem jádra (31) ovinut ve tvaru šroubovice.

2. Lineární vlákný útvar podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že plášť (32) z polymerních nanovláken je tvořen alespoň dvěma vrstvami plochých nanovlákných pásů s uspořádanou strukturou nanovláken vytvořených z nanovlákných vleček (6) při zvlákňování střídavým napětím, přičemž první vrstva je ovinuta kolem jádra (31) a další vrstva/vrstvy je ovínuta/jsou ovínuty kolem vrstvy předcházející.

3. Lineární vlákný útvar podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že jednotlivé vrstvy pláště (32) z polymerních nanovláken jsou vytvořeny z materiálů s odlišnými vlastnostmi.

4. Lineární vlákný útvar podle nároku 2 nebo 3, **vyznačující se tím**, že první vrstva pláště (32) z polymerních nanovláken je vytvořena z adhezního materiálu nebo z materiálu teplem smrštitelného.

5. Lineární vlákný útvar podle jednoho z nároků 2 až 4, **vyznačující se tím**, že vnější vrstva je z krycího materiálu, schopného chránit vnitřní vrstvy před poškozením.

6. Lineární vlákný útvar podle jednoho z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že plášť (32) z polymerních nanovláken vytváří po odstranění jádra (31) z výsledného lineárního vlákného útvaru (30) dutý trubicový útvar.

7. Způsob výroby lineárního vlákného útvaru s pláštěm (32) z polymerních nanovláken obalujícím nosný lineární útvar (3) tvořící jádro (31) ve zvlákňovací komoře (4), v níž je uspořádána zvlákňovací elektroda (5) napájená střídavým vysokým napětím, **vyznačující se tím**, že na zvlákňovací elektrodě (5) napájené střídavým napětím se vytváří nanovlákná vlečka (6), která se ve zvlákňovacím prostoru (41) mění na plochý pás s uspořádanou strukturou nanovláken, který se přivádí k obvodu nosného lineárního útvaru (3) rotujícího ve zvlákňovacím prostoru

kolem vlastní osy a/nebo balonujícího ve zvlákňovacím prostoru s alespoň jednou kmitnou, přičemž pás vytvořený z nanovláknenné vlečky (6) se kolem nosného lineárního útvaru (3) ovíjí a při ovíjení kolem nosného lineárního útvaru (3) vytváří šroubovici.

5 8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že balon se vytváří rotací excentrického členu (23) zákrutového zařízení (2), jímž prochází nosný lineární útvar (3) před vstupem do zvlákňovacího prostoru (41).

9. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že balon se vytváří pulzním foukáním proudu vzduchu na mechanicky roztočený nosný lineární útvar (3).

10 10. Způsob podle libovolného z nároků 7 až 9, **vyznačující se tím**, že pás s uspořádanou nanovláknennou strukturou vytvořený z nanovláknenné vlečky (6) a ovinutý kolem nosného lineárního útvaru (3) ve šroubovici se na nosném lineárním útvaru (3) suší a fixuje.

11. Zařízení k výrobě lineárního vláknenného útvaru obsahující podávací ústrojí (1) nosného lineárního útvaru (3) do zvlákňovací komory (4), v níž je uspořádána zvlákňovací elektroda (5) připojená ke zdroji střídavého vysokého elektrického napětí k vytváření nanovláknenné vlečky (6) směrem k dráze lineárního nosného útvaru a odtahové zařízení (8) výsledného lineárního vláknenného útvaru (30) tvořeného jádrem (31) a pláštěm (32) z polymerních nanovláken ze zvlákňovací komory (4), **vyznačující se tím**, že v dráze nosného lineárního útvaru (3) je uspořádáno zákrutové zařízení (2) schopné vytvářet na nosném lineárním útvaru (3) ve zvlákňovací komoře (4) rotující balon nebo alespoň nepravý zákrut, přičemž v důsledku balonování a/nebo rotace nosného lineárního útvaru (3) je nanovláknenná vlečka ve formě plochého pásu s uspořádanou strukturou nanovlákeniciována kolem nosného lineárního útvaru (3).

12. Zařízení podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že za zvlákňovací komorou (4) je v dráze výsledného lineárního útvaru (30) s nanovláknenným pláštěm (32) uspořádáno sušící a fixační zařízení (7) k sušení a fixaci pásu s uspořádanou nanovláknennou strukturou vytvořeného z nanovláknenné vlečky (6) a ovinutého kolem nosného lineárního útvaru (3) ve šroubovici.

13. Zařízení podle nároku 11 nebo 12, **vyznačující se tím**, že zákrutové zařízení (2) je uspořádáno před zvlákňovací komorou (4).

14. Zařízení podle libovolného z nároků 11 až 13, **vyznačující se tím**, že zákrutové zařízení (2) je uspořádáno za sušícím a fixačním zařízením (7).

30 15. Zařízení podle libovolného z nároků 11 až 14, **vyznačující se tím**, že zákrutové zařízení (2) obsahuje rotující excentrický člen (23).

16. Zařízení podle jednoho z nároků 11 až 15, **vyznačující se tím**, že ve zvlákňovací komoře (4) jsou podle dráhy nosného lineárního útvaru (3) uspořádány alespoň dvě zvlákňovací elektrody (5) za sebou.

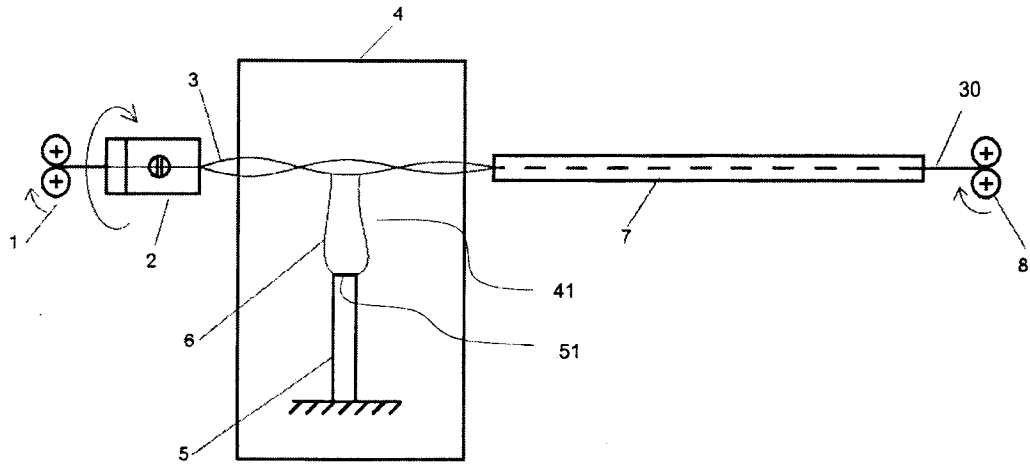
35

5 výkresů

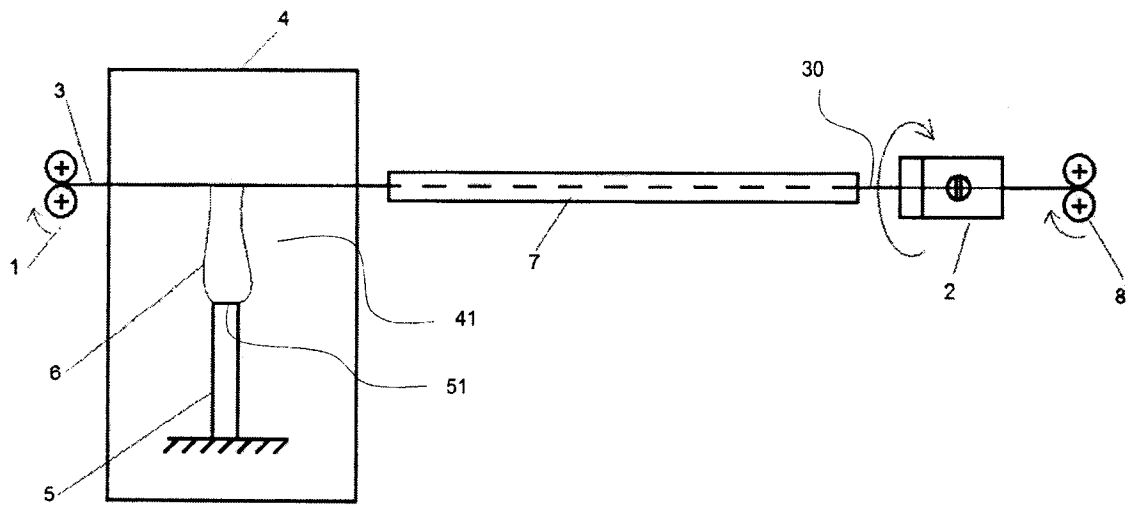
40

Seznam vztahových značek:

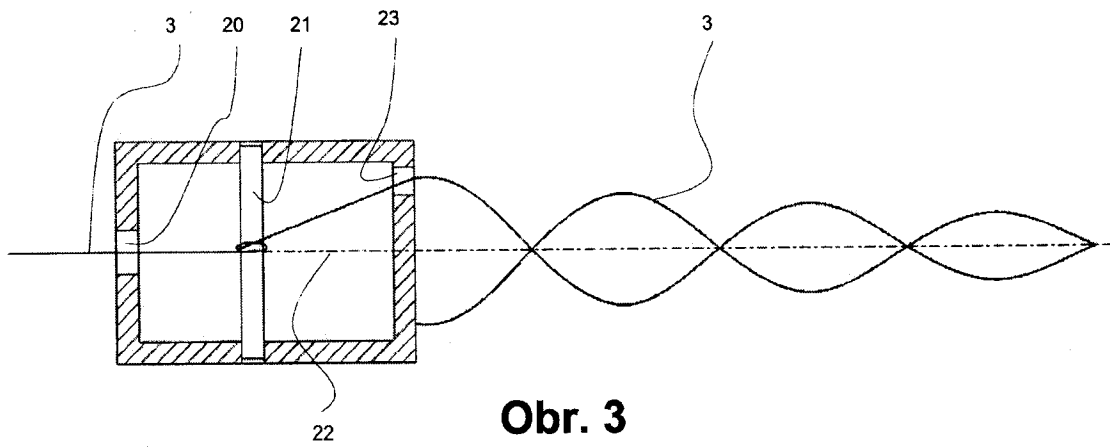
	1	podávací ústrojí
	2	zákrutové zařízení
5	20	vstupní otvor
	21	kolík
	22	osa rotace zákrutového zařízení
	23	excentrický člen
	3	nosný lineární útvar
10	30	výsledný lineární vlákenný útvar s nanovlákným pláštěm
	31	jádro výsledného lineárního vlákenného útvaru
	32	nanovlákný plášť
	4	zvlákňovací komora
	41	zvlákňovací prostor
15	5	zvlákňovací elektroda
	51	čelo zvlákňovací elektrody
	6	nanovlákná vlečka
	7	sušicí a fixační zařízení
20	8	odtahové zařízení



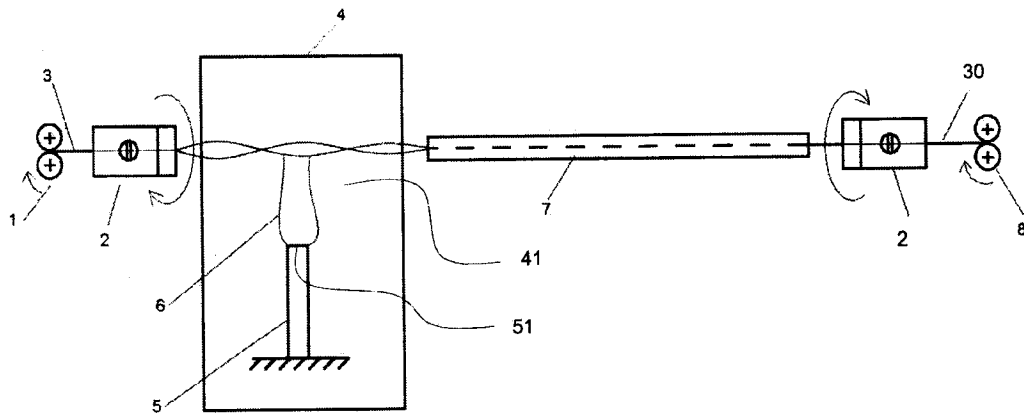
Obr. 1



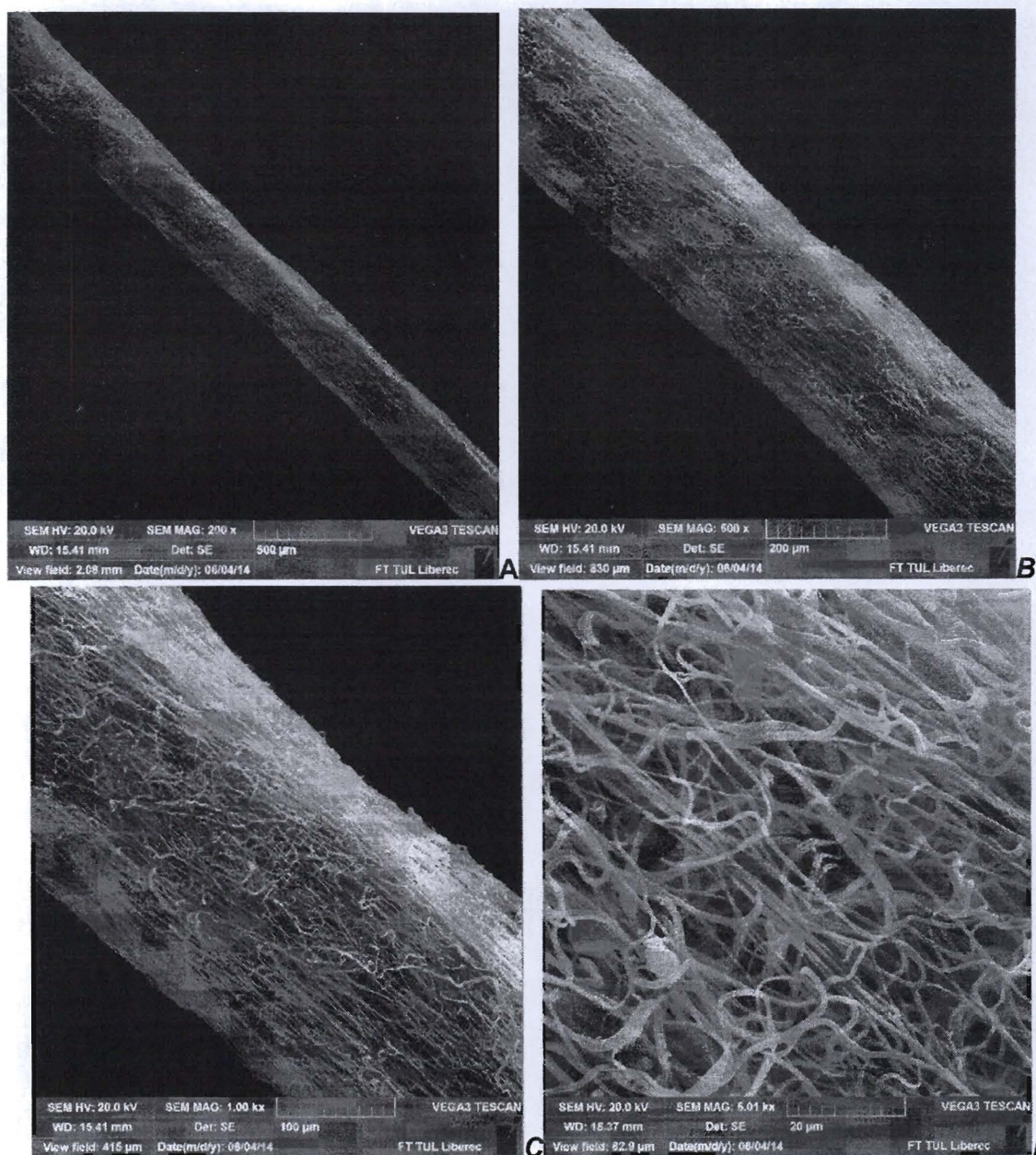
Obr. 2



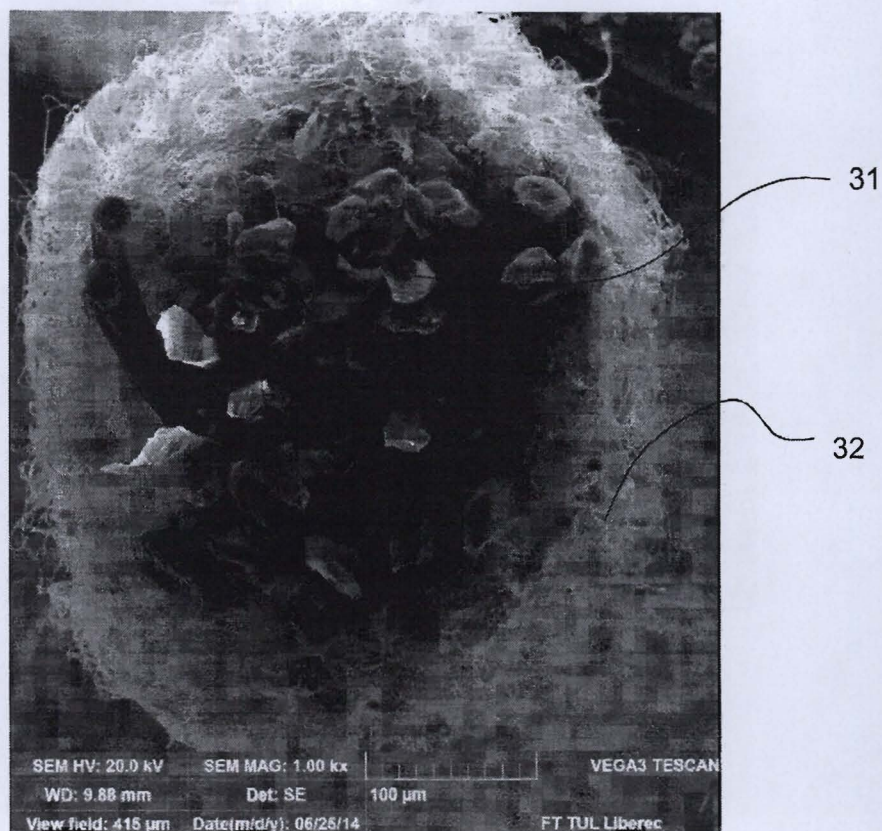
Obr. 3



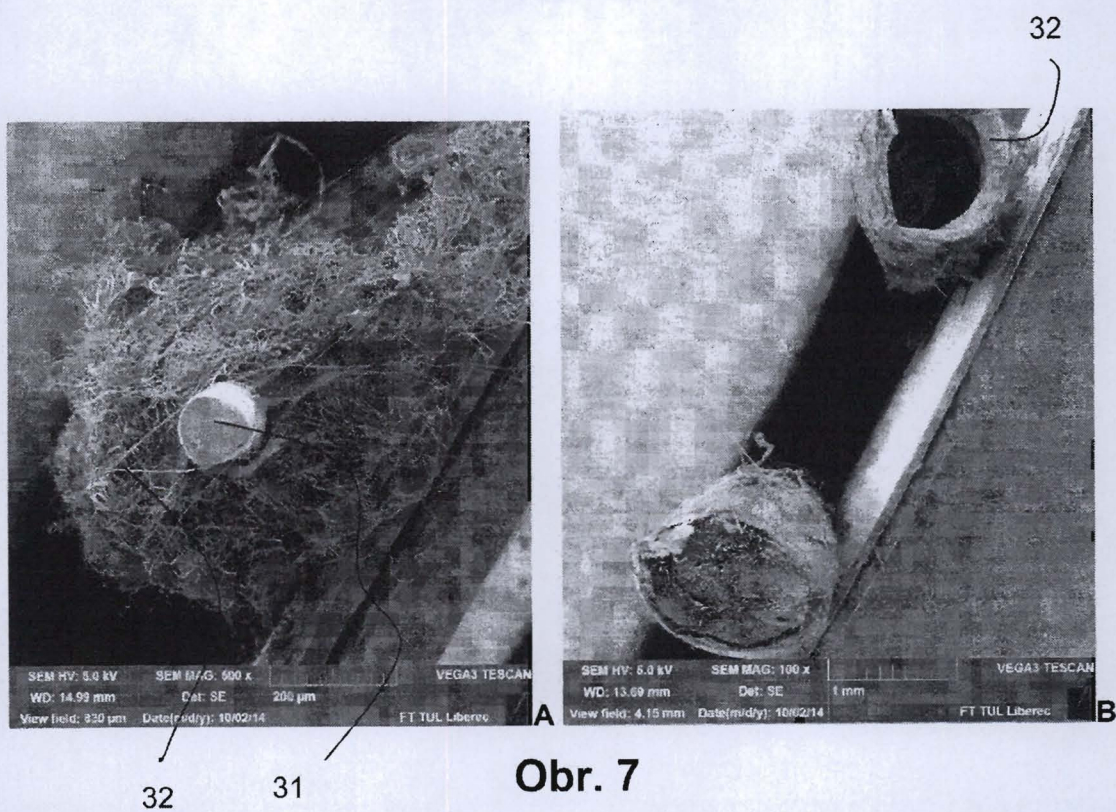
Obr. 4



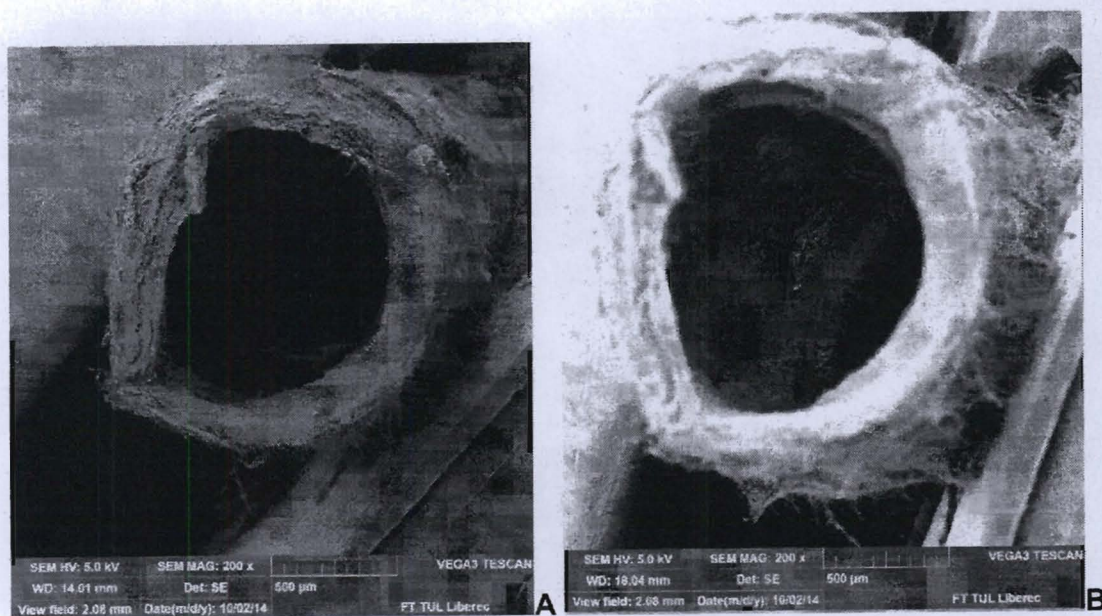
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8

Konec dokumentu

Příloha č. 4

Erben, Jakub; Pilarova, Katerina; Sanetrnik, Filip; et al. : The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering, MATERIALS LETTERS Volume: 143 Pages: 172-176 Published: MAR 15 2015 (IF 2,572)



The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering



Jakub Erben^a, Katerina Pilarova^a, Filip Sanetrnik^a, Jiri Chvojka^a, Vera Jencova^a, Lenka Blazkova^a, Jiri Havlicek^a, Ondrej Novak^a, Petr Mikes^a, Eva Prosecka^b, David Lukas^a, Eva Kuzelova Kostakova^{a,*}

^a Technical University of Liberec, Liberec, Czech Republic

^b Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences, Praha, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2014

Accepted 4 December 2014

Available online 29 December 2014

Keywords:

Meltblown

Electrospinning

Tissue Engineering

Polycaprolactone

ABSTRACT

Materials combining meltblown and electrospinning products with hydroxyapatite powder as potential scaffolds for bone tissue engineering are presented here. The combination of these technologies and parameters and final micro-nanofibrous products are introduced too. The in-vitro testing compared meltblown material, meltblown material with sputtered particles, meltblown material combined with electrospun fibers, meltblown material combined with electrospun fibers and sputtered particles. All the fibrous materials are produced from polycaprolactone. The first in-vitro tests showed the high potential of developed composite materials in bone tissue engineering. The structure of the tested materials allows osteoblasts to proliferate into the sample inner structure with the significant contribution of nanofiber content to cell proliferation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Meltblown is a nonwoven technology which produces fine fibers (1–5 μm) typically from thermoplastic fiber forming polymers by extrusion through a die containing small orifices. Then the fibers are rapidly attenuated by converging streams of hot air and subsequently blown by high-velocity air onto a collector [1]. The technology is very usable and its products are used in many technical, hygienic and medical applications such as filtration media, sorption pads, diapers, breathing masks, disposable cloth and others. The basic polymers used for meltblown nonwoven production are polypropylene [1,2], polyethylene [3], polystyrene [4], polyethylene terephthalate [1,5], polylactic acid [6], polybutylene terephthalate [1] and others. With the exception of polylactic acid, these polymers are not biodegradable and they cannot be used as scaffolds for tissue engineering. Nevertheless, structurally, meltblown materials are suitable for the bone or knee cartilage scaffold due to the small diameter of their fibers, random orientation of fibers, three-dimensional structure, high porosity, optimal pore size etc. [7].

Electrospinning is generally a well known technology for polymer nanofibrous materials production with respect to their application in

biomedical applications [8]. There are many publications confirming their appropriateness as scaffolds for tissue engineering [9,10]. The combination of electrospun materials and particles like hydroxyapatite either inside fibers [11] or in between fibers [12,13] was observed and proposed.

This study aims to fabricate a novel composite material for bone tissue engineering consisting of microfibers produced by meltblown technology ensuring an optimal three-dimensional porous structure and sufficient mechanical properties, electrospun nanofibers for good cell adhesion [14,15] and particles enhancing the biological activity and mineralization of regenerated bone tissue. The production is continuous and all technologies are composed into one step. No additional bonding, shaping etc. is necessary. The successful preliminary in-vitro tests of the scaffolds prepared by the method are described here. The results showed that the composite materials significantly promoted proliferation, viability and cell adhesion compared to simple meltblown materials.

2. Experimental part

Materials: Poly-ε-caprolactone (PCL; M_{ww} 45,000; Sigma Aldrich), chloroform (Penta), ethanol (Et-OH; Penta), hydroxyapatite (HA; calcium hydroxyphosphate; M_{ww} 502.31; powder; Sigma Aldrich) were used for the composite materials production.

* Corresponding author. Tel.: +420 48 535 3233.

E-mail address: eva.kostakova@tul.cz (E. Kuzelova Kostakova).

Scaffold fabrication: A solution of 16 wt% PCL in chloroform/ethanol (9:1 by weight) was prepared for electrospinning. The scheme of production equipment set-up with optimal conditions is shown in Fig. 1. The whole set-up consists of a meltblown device (laboratory equipment J&M Laboratories, USA), electrospinning device (needleless roller electrospinning) and sputtering device. The meltblown extruder screw rotated at 40 rpm, which means 100 g of polymer per 1 h and air velocity at 20 cm from meltblown die was 20 m s^{-1} . The meltblown die length is 15 cm. The spinning of electrospin roller was 50 rpm, diameter was 30 mm and length 15 cm. The roller charging was 35 kV positive and collector charging 20 kV negative.

The sputtering device based on vibration principle consists of three electric motors with the cam amounting to a total length of 15 cm, the movements of which force the powder to fall from a gap of 1 mm. The study compares four different materials: (i) meltblown material (M); (ii) meltblown material with sputtered particles (MS); (iii) meltblown material combining with electrospun fibers (ME); (iv) meltblown material combining with electrospun fibers and sputtered particles (MES). Ambient temperature and relative humidity were 23°C ; 45% during all experiments.

Characterization: Dry scaffolds were sputter-coated with gold and then observed by a scanning electron microscopy (SEM, Tescan

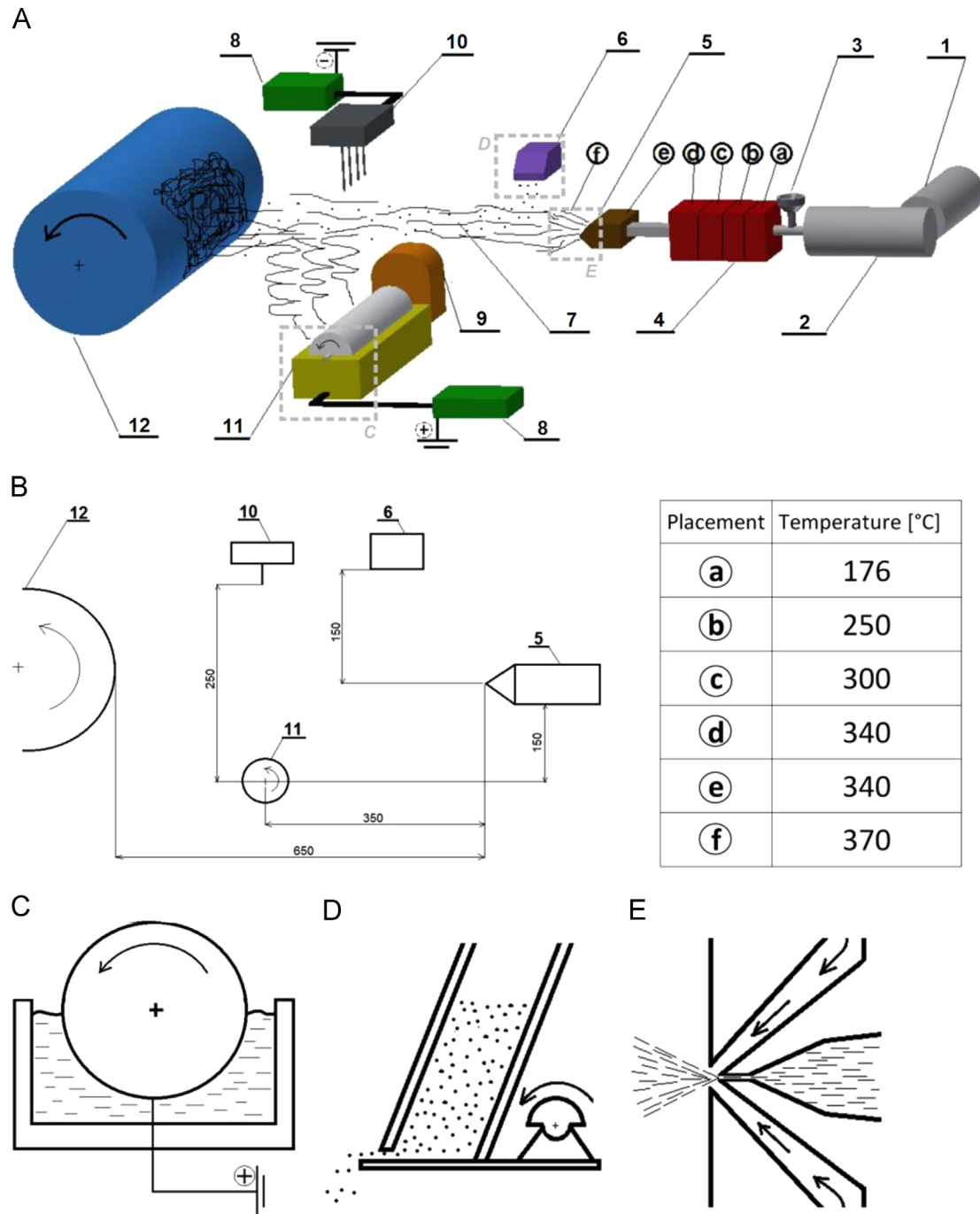


Fig. 1. Scheme of the combination of meltblown and electrospinning with integration of particles in-situ into the producing fibrous material: scheme of whole set-up (A); proportion description in millimeters and optimal temperature set-up (B); details of needle-less electrospinning spinning electrode (C), sputtering device (D) and meltblown die (E) set-ups.

Vega 3SB Easy Probe). The biocompatibility of the material, cell proliferation and ability to migrate into the structure of scaffold was tested in vitro using MG-63 osteoblasts.

In-vitro testing: In-vitro culture of MG-63 osteoblasts: Human osteoblasts (MG63) were maintained in EMEM (Eagle's minimal Essentials medium; ATCC) with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum; Lonza) and 1% penicillin/streptomycin/amfotericin B (Lonza). Cells (the second passage culture) were cultivated in an incubator (37 °C/5% CO₂). The medium was changed 3 times a week.

Sample preparation, cell seeding: Discs (diameter 15 mm, thickness 5 mm) were cut from meltblown layers, they were then sterilized (70% Et-OH, 30 min) and washed in PBS (phosphate buffered saline) (pH 7.4) prior to cell seeding. MG63 cells were seeded (1×10^5 cells per sample) on scaffolds placed in 24-well tissue culture plates.

MTT assay for the cell proliferation: Cell proliferation was monitored after 1, 3, 7, 14 and 21 days by MTT assay (quantitative colorimetric assay for mammalian cell survival and proliferation based on the reduction of tetrazolium salt by living cells). A 250 μ l solution of MTT (2 mg/ml in PBS; pH 7.4) was added to 750 μ l of sample medium (EMEM) and incubated with the sample for 3 h at 37 °C/5% CO₂. Formazane crystals were solubilized with isopropyl alcohol. Absorbance of the formazane solution was measured at 570 nm (reference at 650 nm).

Microscopy analysis (SEM and fluorescence): After 1, 3, 7 and 14 days of cell seeding, the cell-cultured scaffolds were processed for microscopy analysis. The scaffolds were fixed by 2.5% glutaraldehyde and dehydrated with upgrading concentrations of Et-OH (60%, 70%, 80%, 90% and 100%). Samples were analyzed by scanning electron microscope and image analysis software (NIS Elements, Nikon). The cells were fixed in frozen methanol for 15 min, washed in PBS and stained with propidium iodide for 15 min in the dark. Then the layers were washed in PBS and analyzed using a fluorescence microscope (NICON Eclipse Ti-E). A splitting of the samples in half through the thickness allow to observe cell behavior inside the materials.

3. Results and discussion

The resulting materials without HA particles (M and ME) had a surface density of 250 g⁻². When the density of PCL is 1.145 g cm⁻³

and the thickness of materials is 5 mm then porosity is about 95%. The weight percentage of HA was 10%, thus the final surface density of materials with HA particles (MS and MES) was 275 g⁻². Morphology characteristics were studied by SEM visualization, see Fig. 2 and image analysis. The average electrospun fiber diameter was 732 ± 292 nm. Average meltblown fiber diameter was 6.5 ± 4.4 μ m. Nanofibers (fibers with diameter below 1 μ m) volume fraction estimation in ME materials compared to other fibers was 1% and nanofibers numerical fraction compared to the number of other fibers was 56%. In contrast, nanofibers volume fraction estimation in M materials compared to other fibers was 0.1% and nanofibers numerical fraction compared to the number of other fibers was 9%.

In-vitro tests: The pictures from microscopy and MTT assay data reveal similar rates of adhered MG-63 osteoblasts in all kinds of tested materials. However, from the 7th day after cell seeding differences in the cell proliferation rates had been observed. Osteoblasts on samples containing electrospun fibers (ME, MES) showed a significant increase in proliferation (Fig. 3). Also sputtered particles (MS, MES) seem to have a positive effect on the proliferation rate compared to materials without sputtered particles (M, ME). Images showing materials inside (Fig. 3) confirm osteoblasts proliferation into the inner structure of the materials with a significantly higher rate in materials containing nanofibers (ME, MES). Many studies have investigated the effect of porosity on bone tissue regeneration in vivo or bone cells adhesion and proliferation in vitro [16,17]. It was observed that high porosity and large pores of materials enhanced bone ingrowth and the osteointegration of the scaffold after implantation in vivo and enhanced cell proliferation and migration into scaffold in vitro [18–20].

4. Conclusions

A novel scaffold produced by combining meltblown and electrospinning technology with in-situ particle integration in-between fibers was developed. The scaffold has sufficient surface properties and a porous structure. This scaffold is beneficial for cell growth, adhesion and proliferation and may be served as bone substitutes in tissue engineering application. Further studies are focused on its implantation into animal models for the investigation of its behavior in vivo.

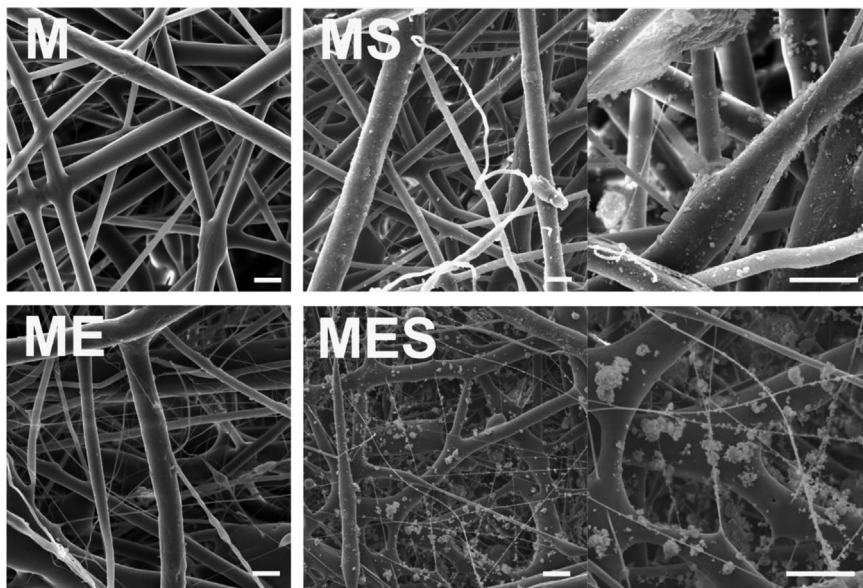


Fig. 2. Scaffold morphology observed by SEM for all four tested materials, the scale bar is 20 μ m.

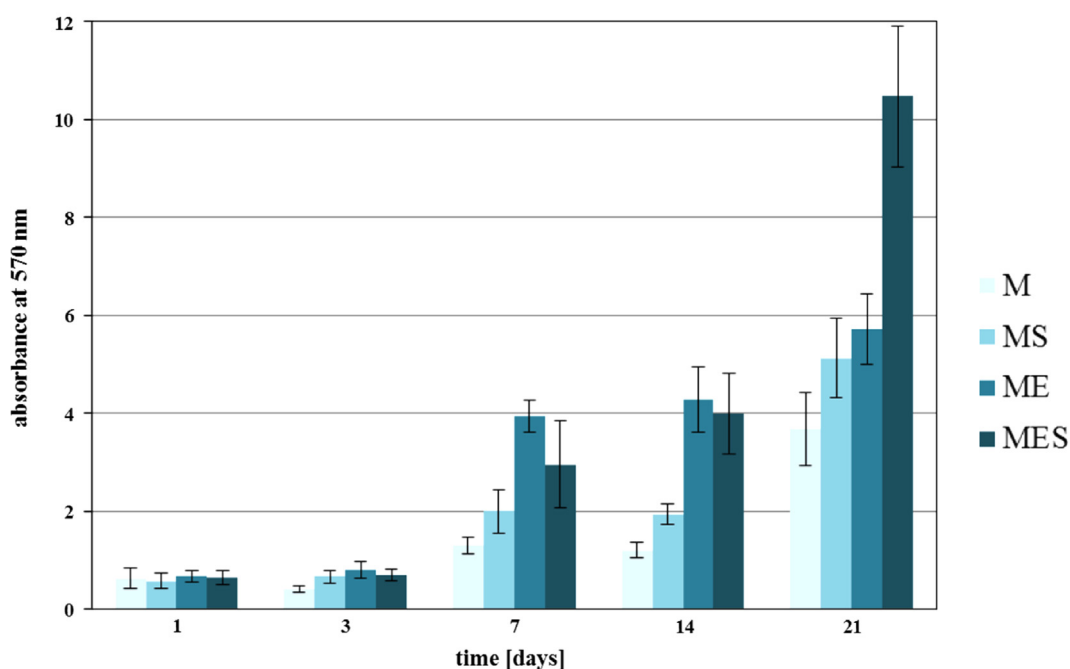
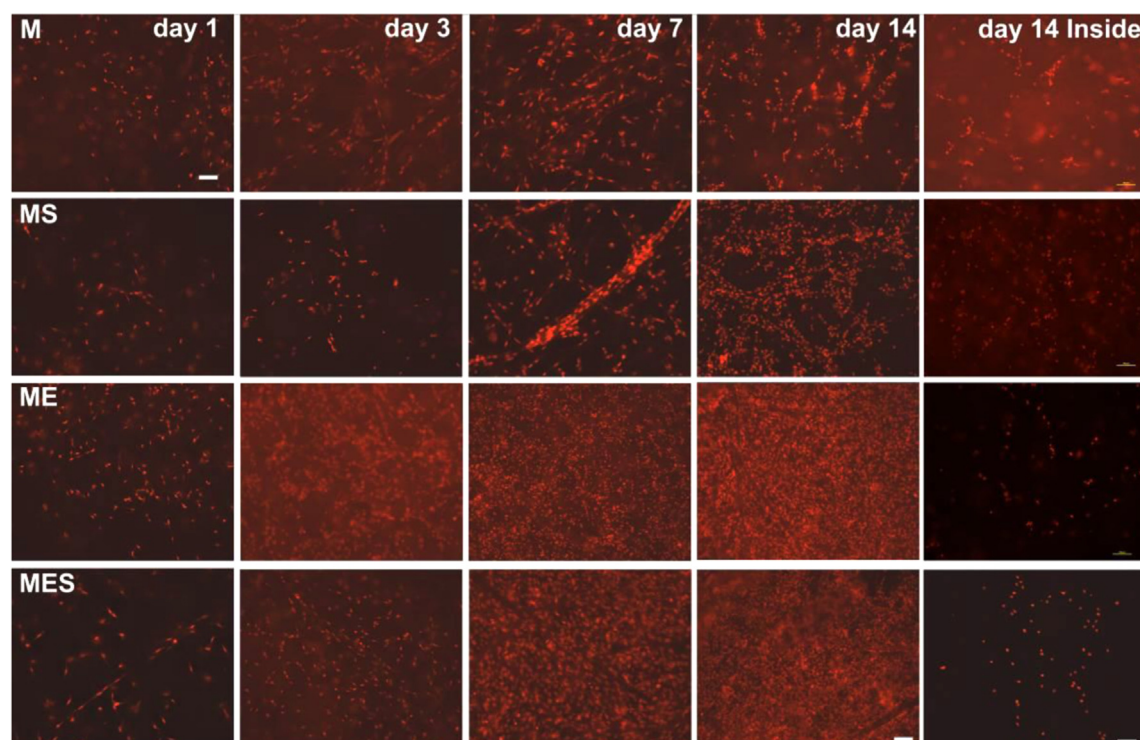


Fig. 3. Fluorescent microscopy images (upper part) of MG-63 cells on the materials (external view) in days 1, 3, 7 and 14. Images are composed of 100 images captured by motorized microscope stage with a changing focus in the z axis of the 1 μ m distance. Fluorescence microscopy images of MG-63 cells on the inner surface of tested materials in day 14 (day 14 inside) presented here as basic views. Cell proliferation on the scaffolds was determined by MTT assay (bottom). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Acknowledgment

The research was supported by the project Nanofiber Materials for Tissue Engineering, reg. no. CZ.1.05/3.1.00/14.0308, which is co-financed by the European Social Fund and the State Budget of the Czech Republic and by the Ministry of Education, Youth and Sports in the framework of the targeted support of the National Programme for Sustainability I LO 1201 and the

OPR&DIproject “Centre for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation”, CZ.1.05/2.1.00/01.0005.

References

- [1] Russell SJ. *Handbook of nonwovens*. Wood head Publishing in Textiles; 2007.
- [2] Gutarowska B, Michalski A. *Fibers Text East Eur* 2009;17:23–8.
- [3] Sun CQ, Zhang D, Liu YB, Xiao RJ. *Appl Polym Sci* 2004;93:2090–4.
- [4] Tan DH, et al. *J Non-newtonian Fluid Mech* 2010;165:892–900.

- [5] Zhang D, Sun C, Xiao JH. Text Res J 2006;76:261–5.
- [6] Shi B, Palfery DJ. Polym Environ 2010;18:122–7.
- [7] Leipzig NC, Athanasiou KA. Cartilage Regeneration. In: Wnek GE, Bowlin GL, editors. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering, vol. 1. Marcel Dekker; 2004. p. 283–91.
- [8] Wenjing L, Sun J, Xingyu JJ. Mater Chem B 2014;2:2369–80.
- [9] Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, Duvail JL, Jiang XY, Yin HL. Prog Polym Sci 2014;39:862–90.
- [10] Leung V, Ko F. Polym Adv Technol Spec Issue: Rev 2011;22:350–65.
- [11] Silva CSR, Luz GM, Gamboa-Marinez TC, Mano JF, Gomez Ribelles JL, Gomez Tejedor JA. J Macromol Sci Part B: Phys 2014;53:5.
- [12] Gandhimathi C, Venugopal J, Ravichandran R, Sundararajan S, Suganya S, Ramakrishna S. Macromol Biosci 2013;13:696–706.
- [13] Kim HW, Lee HH, Knowles JC. J Biomed Mater Res 2006;79:643–9.
- [14] Liang D, Hsiao BS, Chu B. Adv Drug Delivery Rev 2007;59:1392–412.
- [15] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Tissue Eng 2006;12:1197–211.
- [16] Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. J Biomed Mater Res 1970;4:433–56.
- [17] Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. J Biomed Mater Res 1998;39:190–9.
- [18] Karageorgiou V, Kaplan D. Biomaterials 2005;26:5474–91.
- [19] Rampichová M, Buzgo M, Chvojka J, Prosecká E, Kofronová O, Amler E. Cell Adhes Migr 2014;8:36–41.
- [20] Rampichová M, Chvojka J, Buzgo M, Prosecká E, Mikeš P, Vysloužilová L, Tvrdík D, Kochová P, Gregor T, Lukáš D, Amler E. Cell Prolif 2013;46:23–37.

Příloha č. 5

Rampichova, Michala; Buzgo, Matej; Chvojka, Jiri; et al.: Cell penetration to nanofibrous scaffolds, CELL ADHESION & MIGRATION Volume: 8 Issue: 1 Pages: 36-41 Published: JAN 1 2014 (IF 3,872)

Patentová přihláška: Kryt kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a způsob výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty



Cell penetration to nanofibrous scaffolds

Michala Rampichová, Matej Buzgo, Jiří Chvojka, Eva Prosecká, Olga Kofroňová & Evžen Amler

To cite this article: Michala Rampichová, Matej Buzgo, Jiří Chvojka, Eva Prosecká, Olga Kofroňová & Evžen Amler (2014) Cell penetration to nanofibrous scaffolds, Cell Adhesion & Migration, 8:1, 36-41, DOI: [10.4161/cam.27477](https://doi.org/10.4161/cam.27477)

To link to this article: <https://doi.org/10.4161/cam.27477>



Published online: 01 Jan 2013.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 375



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 8 View citing articles [↗](#)

Cell penetration to nanofibrous scaffolds

Forcespinning[®], an alternative approach for fabricating 3D nanofibers

Michala Rampichová^{1,2,*}, Matej Buzgo^{1,2}, Jiří Chvojka^{3,4}, Eva Prosecká¹, Olga Kofroňová⁵, and Evžen Amler^{1,2,6,7}

¹Laboratory of Tissue Engineering; Institute of Experimental Medicine; Academy of Science of the Czech Republic; Prague, Czech Republic; ²University Center for Energy Efficient Buildings (UCEEB); The Czech Technical University in Prague; Kladno, Czech Republic; ³Technical University of Liberec; Faculty of Textile Engineering; Department of Nonwoven Textiles; Liberec, Czech Republic; ⁴Technical University of Liberec; Institute for Nanomaterials; Advanced technologies and Innovation; Liberec, Czech Republic; ⁵Laboratory of Molecular Structure Characterization; Institute of Microbiology; Academy of Sciences of the Czech Republic; Prague, Czech Republic; ⁶Institute of Biophysics; 2nd Faculty of Medicine; Charles University in Prague; Prague, Czech Republic; ⁷Czech Technical University in Prague; Faculty of Biomedical Engineering; Kladno, Czech Republic

Cell infiltration is a critical parameter for the successful development of 3D matrices for tissue engineering. Application of electrospun nanofibers in tissue engineering has recently attracted much attention. Notwithstanding several of their advantages, small pore size and small thickness of the electrospun layer limit their application for development of 3D scaffolds. Several methods for the pore size and/or electrospun layer thickness increase have been recently developed. Nevertheless, tissue engineering still needs emerging of either novel nanofiber-enriched composites or new techniques for 3D nanofiber fabrication. Forcespinning[®] seems to be a promising alternative. The potential of the Forcespinning[®] method is illustrated in preliminary experiment with mesenchymal stem cells.

Strategies to Increase the Pore Size of Electrospun Layers

Because of their structure, which mimics the natural extracellular matrix, nano- and microfibrous layers are promising materials for tissue engineering and for regenerative medicine.¹ They have some extraordinary properties, such as huge porosity, fiber diameter similar to that of fibrillar proteins, and an enormous surface-to-volume ratio. However, electrospun fibers have some disadvantages for tissue engineering applications, above

all their limited thickness, their small pore size, and their planar 2D structure. Various strategies have been applied to overcome these disadvantages and to fabricate nanofibers with huge pores and a 3D structure.

Systems combining insoluble fibers and sacrificial co-fibers,^{2,3} salt leaching,⁴ ice crystals,⁵ and photopatterning⁶ have been used to increase the pore size of prepared nanofibers. Ultrasonification in an aqueous solution is another physical method that has been used in the electrospinning process to extend the thickness and the porosity of the layer.⁷ The application of ultrasound resulted in increased scaffold pore size and enhanced cellular infiltration and proliferation in vitro. In another study, PLGA nanofibers with Degrapol[®] (a bioresorbable polyurethane) as a sacrificial part of the system enabled deeper cell penetration to the scaffold.⁸

In addition, systems employing patterned collectors have been used to increase the pore size. The use of classical non-patterned collectors results in homogeneous distribution of the electric field and random orientation of the nanofibers. Non-homogeneous distribution of the electric field on the patterned collector results in changed deposition of the nanofibers, which correlates with the local electric field intensity and is driven by Coulombic forces.⁹ Li et al.^{9–11} developed patterned static collectors consisting of conductive and non-conductive

Keywords: mesenchymal stem cells, cell penetration, fibrous scaffold, Forcespinning[®], electrospinning

*Correspondence to: Michala Rampichová;
Email: m.rampichova@biomed.cas.cz

Submitted: 09/04/2013; Revised:
12/06/2013; Accepted: 12/10/2013

<http://dx.doi.org/10.4161/cam.27477>

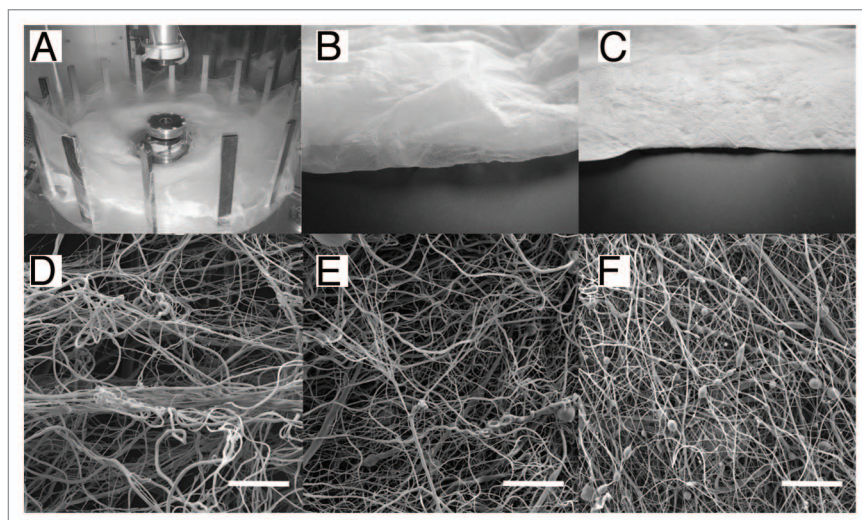


Figure 1. Morphology of layers produced by Forcespinning® technology (A). Macroscopic view of Sample 2 deposited by static deposition (B). Macroscopic view of Sample 3 deposited by vacuum assisted deposition (C). SEM morphology of Sample 1 (D), Sample 2 (E), Sample 3 (F). Scale bar 100 μm .

void spaces. Nanofibers were aligned across a non-conductive void. Another approach was introduced by Zussman et al.¹² They used a rotating table placed on a rotating disc moving 90° between the steps of deposition. The fibrous mesh that was produced had a square “mesh” orientation of the nanofibers, as the second layer was oriented perpendicular to the first layer. Another approach is based on parallelization of the nanofibers. Parallelizing the fibers increased the pore size of the meshes without altering the fiber diameter. For example, Zhu et al.¹³ used a rotating frame cylinder for preparing a parallelized fibrous mesh. Vaquette and Cooper-White¹⁴ tested nanofibrous meshes deposited on patterned collectors. They found that increased pore size of a patterned mesh enabled deeper cell penetration to the scaffold. Recently, we introduced a study¹⁵ in which nanofibrous layers prepared using a structured collector were used as a scaffold for mesenchymal stem cell (MSC) seeding. The structure of the scaffold with increased pore size improved the cell proliferation and, moreover, the osteogenic differentiation of the cells, in comparison with a non-structured layer. A patterned surface with spots of different surface mass density caused increased pore sizes in the less dense areas. The pore sizes were huge enough to enable MSCs to penetrate through the fibrous layer. Migration

of cells is very advantageous in bone tissue engineering applications.

Interestingly, the knitted-like structure of the fibrous mesh also improved the biomechanical properties of the mesh, which is of importance for tissue engineering of skin or tendon.

Strategies to Increase the Thickness of Electrospun Layers

In addition, various strategies were used to increase the thickness of the fibrous layers. One of the easiest ways to produce 3D fibrous structures is with the use of sequential or multilayering electrospinning. Using these methods, electrospun layers hundreds of microns in thickness can be produced. Han et al.¹⁶ prepared a multilayered electrospun layer mimicking the ECM of the urinary bladder in a single-step process. Another way is to modify simple electrospun layer by bending, folding, or stacking. Chen et al.¹⁷ prepared nanofiber structures with aligned or randomly oriented nanofibers. They overlaid five cell-seeded layers, and prepared two types of 3D scaffold, with aligned or random orientation of the nanofibers. An interesting method for preparing thicker nanofibrous layer was introduced by Shabani et al.¹⁸ They used focused infrared irradiation during the electrospinning process. The lamps were

arrayed in a manner such that their light was focused on the last third of the top-to-collector distance. As a result, a nanofibrous layer was prepared, which was 10 times thicker than the layer from conventional electrospinning and showed a less dense structure than when conventional electrospinning was used. In addition, special collectors were used to prepare 3D nanofibers. A liquid bath was used as a collector in an electrospinning technique known as “wet electrospinning.” The pore size and the thickness of the nanofibers that were produced was dramatically increased.¹⁹ Blakeney et al.²⁰ demonstrated the use of a grounded spherical dish collector with an array of needle-like probes. The nanofibers that were prepared exhibited a loosely packed 3D structure with a ball-like morphology. The loose ball-like morphology enabled cell penetration into the scaffold.

Forcespinning as an Alternative Method for Producing 3D Nanofibers

Recently, Forcespinning® was introduced as a novel method for producing polymeric nanofibers. While electrospinning is based on the electrostatic forces between an electrically charged solution and a collector with the opposite charge, Forcespinning® uses a centrifugal force to produce ultra-thin fibers. As a consequence, Forcespinning® can prepare layers both from solutions and from melts. This eliminates some limitations of electrospinning, e.g., high electric voltage, and the need to use dielectric solvents. The Forcespinning® process has already been described in detail elsewhere.^{21–23} The device for Forcespinning® is composed of a spinneret loaded with a polymer solution or a melt. While the fiber is being produced, the polymer solution is drawn from the orifice by rotating forces. Subsequently, the solution is evaporated from the fibers and they are deposited on a collector. The main parameters influencing the Forcespinning® process are the centrifugal force that is used, the viscosity of the solution or melt, the diameter of the collector, the radius of the orifice, and solvent evaporation rate.²² A well-balanced force must be used. It must be

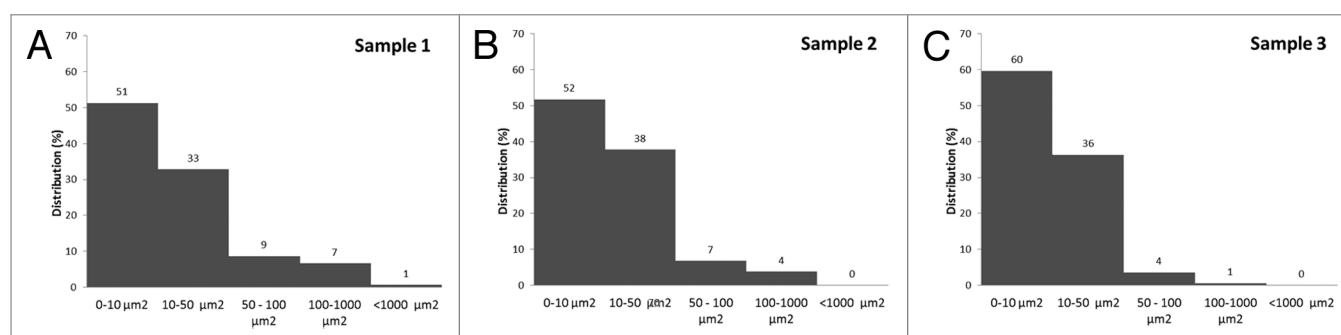


Figure 2. Proportional distribution of pore sizes determined from SEM stereological analysis. Different distributions of pore sizes were seen in the samples. While proportional representations of pores were similar in samples prepared by classic deposition (Sample 1 [A] and Sample 2 [B]), smaller pores predominated in Sample 3 [C]).

high enough to overcome the surface tension of the solution or melt, but not too high to form polymeric beads. Similarly, the viscosity of the polymer solution has to be chosen appropriately. If the viscosity is high, the forces being used to draw the fiber may not be strong enough to create a jet. However, beads can be produced when a solution with low viscosity is used. The diameter of the orifice is also an important factor in the process. A decrease in the diameter of the orifice reduced the overall diameter of the fibers. The orientation and the geometry of the orifice also have effect on fiber formation.²¹ Another important parameter is the evaporation rate of the solvents from the polymer solution. If the evaporation rate of the solvent is too low, the fibers may be converted into a thin film as the layers build up on the collector and the fibers that are still wet merge. If the evaporation rate is relatively high, the elongation process of the polymer jet is disturbed, and fibers of large diameter are produced. The distance between the spinneret and the collector, which is determined by the diameter of the collector, is not as crucial as in electrospinning. The critical distance is too short to enable the fibers to be stretched. However, when this critical distance is exceeded, the reduction in fiber diameter with increasing distance becomes minimal. The Forcespinning® process enables relatively thick, fluffy fibrous layers to be produced. Scaffolds of this kind, with a highly porous 3D structure, are desired for tissue engineering applications.

Forcespinning® produces a loose and highly porous fibrous mesh. To the best of our knowledge, no study has been

Table 1. Description of prepared micro/nano-fibers

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Solution	50% PCL	50% PCL	50% PCL
RPM	10 000	10 000	10 000
Orifice	G20	G30	G30
Deposition mode	static deposition	static deposition	vacuum deposition
Fiber diameter	thin - $0.76 \pm 0.21 \mu\text{m}$; thick - $2.37 \pm 1.44 \mu\text{m}$	thin - $0.76 \pm 0.19 \mu\text{m}$; thick - $2.36 \pm 1.03 \mu\text{m}$	thin - $0.76 \pm 0.3 \mu\text{m}$; thick - $2.27 \pm 1.12 \mu\text{m}$
Mean pore size (μm^2)	64.5 ± 119.2	42.1 ± 53.7	29.8 ± 27.2
Maximal pore size (μm^2)	1592.3	762.9	253.7

published describing the interaction of mesenchymal stem cells with Forcespun nanofibers. We therefore performed a preliminary experiment, in which scaffolds from PCL layers prepared by Forcespinning® were seeded with MSCs and visualized by confocal microscopy. Forcespinning® of 40% (w/v) PCL in chloroform:ethanol (volume ratio 9:1) were processed using Cyclone 1000 L/M Forcespinning® equipment with a metallic plate with a G30 or G20 orifice with a rotation speed of 10 000 RPM (Fig. 1A). The samples were deposited either on a stationary deposition system or with the use of vacuum-assisted deposition. The meshes that we produced had different macroscopic and microscopic morphologies. While the bulk fiber mesh deposited on the stationary deposition system exhibited a loosely-packed 3D structure (Sample 1 and Sample 2 [Fig. 1A and B]), Forcespinning® conditions are

listed in Table 1), the fibers deposited by vacuum-assisted deposition exhibited a packed “electrospinning-like” morphology (Sample 3 [Fig. 1C]). The SEM measurements (Fig. 1D–F) showed that Forcespinning® resulted in the formation of nano- and microfibers. The diameters of the fibers for all samples were similar. The thin nanofibers had mean diameter of $0.76 \mu\text{m}$, and the mean diameter of thick microfibers was around $2.3 \mu\text{m}$. Stereological analysis showed differences between studied groups. Sample 1 had the biggest mean pore size ($64.5 \mu\text{m}^2$) and the biggest maximal pore size ($1592.3 \mu\text{m}^2$).

The mean pore size of Sample 2 was smaller ($42.1 \mu\text{m}^2$); however, it still was higher than Sample 3, which was deposited using vacuum-assisted deposition ($29.8 \mu\text{m}^2$). All stereological data are showed in Table 1. Proportional representation of pore sizes in the samples is shown in Figure 2. The samples were sterilized

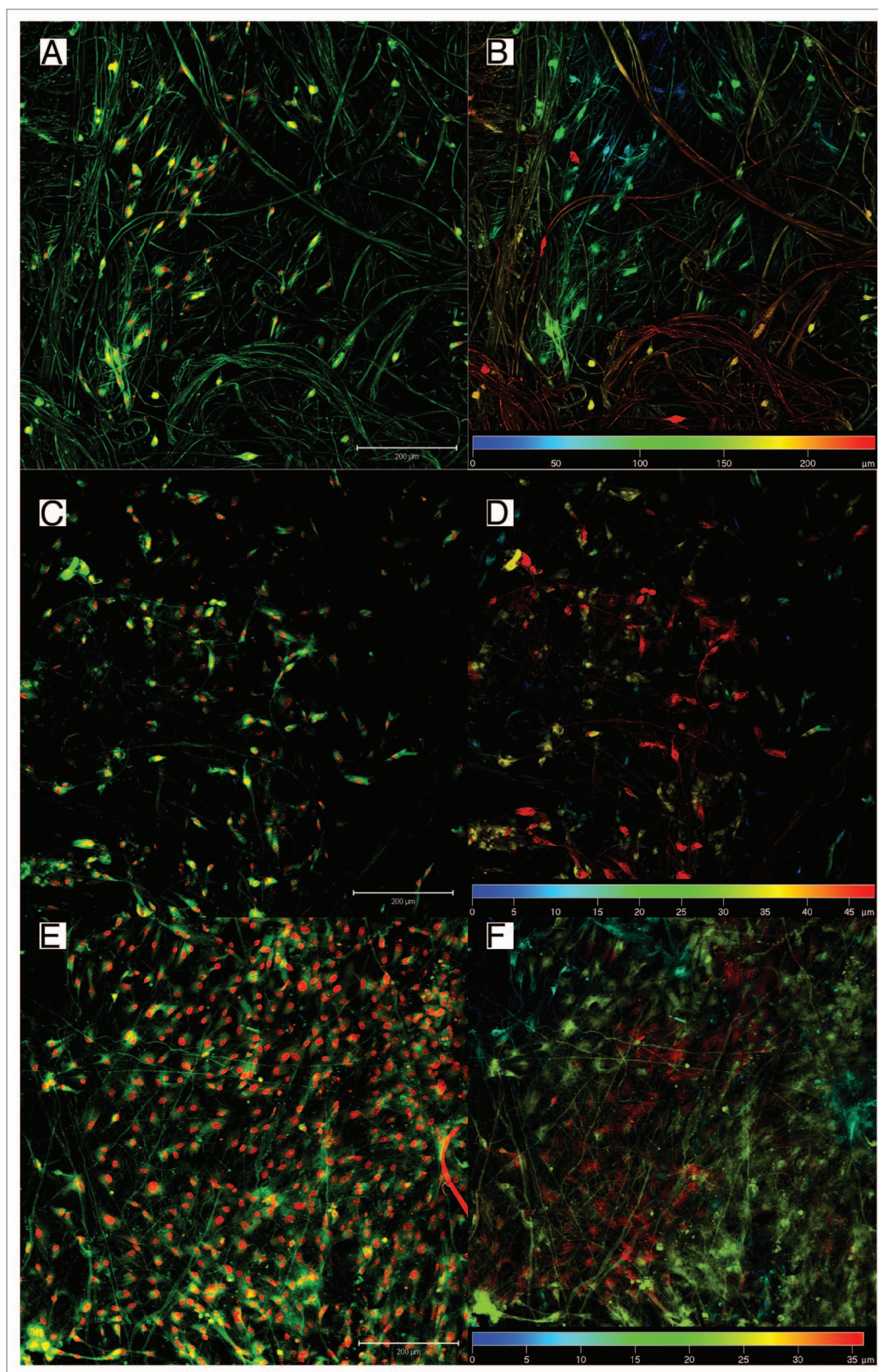


Figure 3. Confocal microscopy of MSCs seeded on fibers scaffolds prepared by Forcespinning®. Cells were stained with DiOC6 (green color) and propidium iodide (red color)—left column. Depth color projection was used to visualize distribution of the cells in scaffolds (right column). Cells penetrated to the depth more than 200 μm in scaffold Sample 1 (50% PCL, G20 orifice) (**A and B**). In the case of Sample 2—50% PCL, G30 orifice, classic deposition (**C and D**); and Sample 3—50% PCL, G30 orifice, CVD (**E and F**) the penetration was considerably smaller. The micrograph shows in figures A, C, and E mesenchymal stem cells stained with DiOC6 for membranes (green) and propidium iodide for nuclei (red). Figures B, D, and F represent color-coded depth profile of cells on scaffolds.

in 70% ethanol and seeded with porcine mesenchymal stem cells (approximately 5.4×10^5 cells/cm²). In order to visualize the penetration of the cells into the scaffolds, on day 6 after cell seeding, the samples were stained with DiOC and propidium iodide and were visualized by confocal microscopy, as was described previously.¹⁵ Briefly, the samples were fixed in frozen methyl-alcohol (-20 °C) and incubated with the fluorescent probe 3,3'-diethyloxycarbocyanine iodide (DiOC6; 0.1–1 µg/mL in PBS; pH 7.4) and subsequently with propidium iodide (PI; 5 µg/mL in PBS). A ZEISS LSM 5 DUO confocal microscope was used for visualizing the samples (PI: $X_{exc} = 561$ nm, $X_{em} = 630$ –700 nm; DiOC6: $X_{exc} = 488$ nm, $X_{em} = 505$ –550 nm). The results of the study showed that the MSCs on Sample 1 (50% PCL from G20 orifice at speed 10 000 RPM) penetrated through the scaffold to a depth greater than 250 µm (Fig. 3B). This kind of deep cellular infiltration is sufficient for the formation of 3D scaffolds. However, the cells on Sample 2 and Sample 3 did not penetrate deeper than 50 µm (Fig. 3D and F). This kind of penetration is similar to the penetration in electrospun nanofibers. On non-patterned 2D PCL nanofibers, the cell infiltration depth was 50 µm (Fig. 4B), while on patterned 3D nanofibers, the infiltration depth was 80 µm (Fig. 4D). The Forcespinning® method is able to produce 3D constructs, but the cell penetration is highly dependent on pore size. In the case of samples with high porosity and huge pores, the penetration rate overcame the electrospun nanofibers. These preliminary results suggest that Forcespun nanofibers have huge potential for tissue engineering applications where deep cell penetration is necessary. However, the method is relatively new, and it is necessary to carry out more detailed testing and optimization in order to take full advantage of the prepared scaffolds.

Conclusion

Electrospinning, a well-known nanofiber fabrication technique, efficiently form nanofibrous meshes from various polymers. However, the classical deposition technique often suffers from the formation of a fibrous mesh with small pore size, resulting in poor

cellular infiltration. Cellular infiltration is critical for the formation of 3D tissue engineering constructs. Various strategies to increase the mean pore size and the thickness of the fibrous layer have therefore been proposed in recent years. Although the results of the studies are promising, the methods often use a complex experimental setup and their productivity is limited. However, a novel method based on centrifugal spinning may overcome these disadvantages. Forcespinning® technology enables the preparation of highly porous micro- and nanofibrous layers with considerable thickness. These properties are advantageous for tissue engineering applications, where 3D structured fibers with huge interconnected pores are necessary to enable the cells to migrate and communicate. The properties, the thickness, and the pore size of forcespun fibers are

highly dependent on the device settings, which makes this method easily scalable for various applications.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This study was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic, institutional research plans AV0Z50390703, AV0Z50390512, and the Institutional Research Concept RVO 61388971, The Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic (project IPv6), The Grant Agency of the Charles University (grant No., 626012, 384311, 270513, 330611, 648112), and Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NT12156).

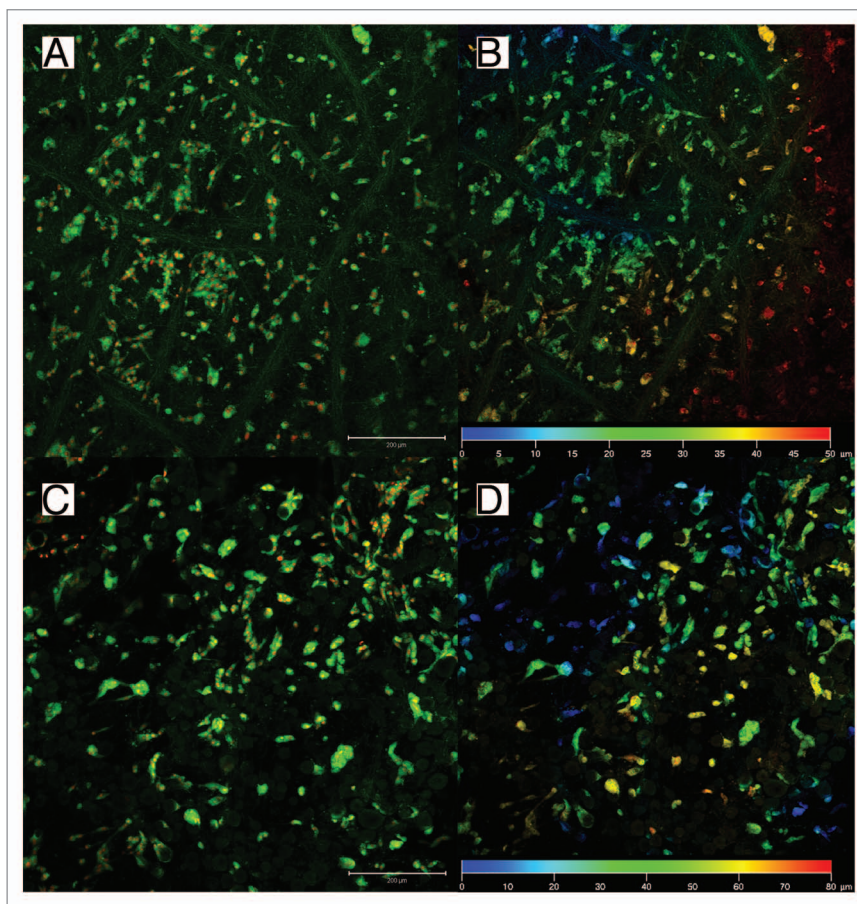


Figure 4. Penetration of mesenchymal stem cells to electrospun nanofibers on day 7. Penetration to non-patterned 2D nanofibers (**A and B**) and patterned 3D nanofibers (**C and D**). The micrograph shows in figures A and C MSCs stained with DiOC6 for membranes (green) and propidium iodide for nuclei (red). Figures B and D represents color-coded depth profile of cells on scaffolds.

References

1. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29:1989-2006; PMID:18281090; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>
2. Baker BM, Gee AO, Metter RB, Nathan AS, Marklein RA, Burdick JA, Mauck RL. The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials* 2008; 29:2348-58; PMID:18313138; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.032>
3. Guimarães A, Martins A, Pinho ED, Faria S, Reis RL, Neves NM. Solving cell infiltration limitations of electrospun nanofiber meshes for tissue engineering applications. *Nanomedicine (Lond)* 2010; 5:539-54; PMID:20528450; <http://dx.doi.org/10.2217/nmm.10.31>
4. Nam J, Huang Y, Agarwal S, Lannutti J. Improved cellular infiltration in electrospun fiber via engineered porosity. *Tissue Eng* 2007; 13:2249-57; PMID:17536926; <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.0306>
5. Simonet M, Schneider OD, Neuenschwander P, Stark WJ. Ultraporous 3D polymer meshes by low-temperature electrospinning: Use of ice crystals as a removable void template. *Polym Eng Sci* 2007; 47:2020-6; <http://dx.doi.org/10.1002/pen.20914>
6. Sundararaghavan HG, Metter RB, Burdick JA. Electrospun fibrous scaffolds with multiscale and photopatterned porosity. *Macromol Biosci* 2010; 10:265-70; PMID:20014198; <http://dx.doi.org/10.1002/mabi.200900363>
7. Lee JB, Jeong SI, Bae MS, Yang DH, Heo DN, Kim CH, Alsberg E, Kwon IK. Highly porous electrospun nanofibers enhanced by ultrasonication for improved cellular infiltration. *Tissue Eng Part A* 2011; 17:2695-702; PMID:21682540; <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0709>
8. Milleret V, Simona B, Neuenschwander P, Hall H. Tuning electrospinning parameters for production of 3D-fiber-fleeces with increased porosity for soft tissue engineering applications. *Eur Cell Mater* 2011; 21:286-303; PMID:21432783
9. Li D, Wang Y, Xia Y. Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays. *Nano Lett* 2003; 3:1167-71; <http://dx.doi.org/10.1021/nl0344256>
10. Li D, Wang Y, Xia Y. Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films. *Adv Mater* 2004; 16:361-6; <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200306226>
11. Li D, Ouyang G, McCann JT, Xia Y. Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes. *Nano Lett* 2005; 5:913-6; PMID:15884893; <http://dx.doi.org/10.1021/nl0504235>
12. Zussman E. Formation of nanofiber crossbars in electrospinning. *Appl Phys Lett* 2003; 82:973; <http://dx.doi.org/10.1063/1.1544060>
13. Zhu X, Cui W, Li X, Jin Y. Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering. *Biomacromolecules* 2008; 9:1795-801; PMID:18578495; <http://dx.doi.org/10.1021/bm800476u>
14. Vaquette C, Cooper-White JJ. Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration. *Acta Biomater* 2011; 7:2544-57; PMID:21371575; <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.036>
15. Rampichová M, Chvojka J, Buzgo M, Prosecká E, Mikeš P, Vysloužilová L, Tvrdík D, Kochová P, Gregor T, Lukáš D, et al. Elastic three-dimensional poly (ϵ -caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2013; 46:23-37; PMID:23216517; <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12001>
16. Han D, Gouma P-I. Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix. *Nanomedicine* 2006; 2:37-41; PMID:17292114
17. Chen X, Fu X, Shi JG, Wang H. Regulation of the osteogenesis of pre-osteoblasts by spatial arrangement of electrospun nanofibers in two- and three-dimensional environments. *Nanomedicine* 2013; 9:1283-92; PMID:23665421
18. Shabani I, Haddadi-Asl V, Seyedjafari E, Soleimani M. Cellular infiltration on nanofibrous scaffolds using a modified electrospinning technique. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423:50-4; PMID:22618233; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.069>
19. Ki CS, Park SY, Kim HJ, Jung HM, Woo KM, Lee JW, Park YH. Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration. *Biotechnol Lett* 2008; 30:405-10; PMID:17973083; <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-007-9581-5>
20. Blakeney BA, Tambralli A, Anderson JM, Andukuri A, Lim DJ, Dean DR, Jun HW. Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2011; 32:1583-90; PMID:21112625; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.056>
21. Padron S, Fuentes A, Caruntu D, Lozano K. Experimental study of nanofiber production through forspinning. *J Appl Phys* 2013; 113:024318-9; <http://dx.doi.org/10.1063/1.4769886>
22. Dabirian F, Hosseini Ravandi SA, Pishevar AR, Abuzade RA. A comparative study of jet formation and nanofiber alignment in electrospinning and electrocentrifugal spinning systems. *J Electrostat* 2011; 69:540-6; <http://dx.doi.org/10.1016/j.elstat.2011.07.006>
23. Sarkar K, Gomez C, Zambrano S, Ramirez M, de Hoyos E, Vasquez H, Lozano K. Electrospinning to Forcespinning™. *Mater Today* 2010; 13:12-4; [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70199-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70199-1)

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-404

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16.06.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.02.2017**

(Věstník č. 7/2017)

A61L 15/44 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 36/18 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/62 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61L 15/22 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Technická univerzita v Liberci, Liberec, CZ

(72) Původce:
Ing. Jiří Chvojka, Ph.D., Liberec, CZ
prof. RNDr. David Lukáš, CSc., Liberec, CZ
doc. Ing. Eva Kuželová-Košťáková, Ph.D., Turnov, CZ
Ing. Petr Mikeš, Ph.D., Mníšek u Liberce, CZ
Ing. Andrea Klapšťová, Koberovy, CZ
Ing. Jakub Erben, Vrchlabí, CZ
Denisa Zálešáková, Jablonec nad Nisou, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, Zábrdovická 11, 615 00 Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Kryt kůže nebo rány, který obsahuje
canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty,
polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná
obsahující canabidiol a/nebo jeho
derivát/deriváty, a způsob výroby
polymerních nanovláken a/nebo
mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo
jeho derivát/deriváty**

(57) Anotace:
Vynález se týká krytu kůže nebo rány, který obsahuje
canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, který je tvořen
nebo obsahuje vrstvu (1), která obsahuje nanovlákná
a/nebo mikrovlákná biologicky kompatibilního
polymeru/polymerů, která obsahuje canabidiol a/nebo
jeho derivát/deriváty uložený na povrchu a/nebo
v materiálu nanovláken a/nebo mikrovláken.



- 5 **Kryt kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, polymerní nanovlákn a/nebo mikrovlákn obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a způsob výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty**

Oblast techniky

Vynález se týká krytu kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

- 10 Vynález se dále týká také polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken, která obsahují canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

Kromě toho se vynález týká také způsobu výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

15

Dosavadní stav techniky

- 20 S rostoucí intenzitou používání konopí pro lékařské účely, a s tím souvisejícím výzkumem, se v poslední době postupně ukazuje, že řada léčivých složek je, a to často ve větším množství než v konopí indickém, obsažena také v technických odrůdách konopí, jako např. v konopím setém. Nejvýznamnější takovou složkou je canabidiol (nebo také cannabidiol či CBD), což je nehalucinogenní látka s vysokými protizánětlivými (až 20x účinnější než kyselina acetylsalicylová) a bolest tlumícími účinky, která má velmi příznivý vliv zejména na kožní problémy – záněty, ekzémy (vč. atopického), akné,
- 25 opruzeniny, opary, lupénku, atd., případně i na léčení ran či popálenin.

- 30 V současné době se canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty zapracovávají do mastí nebo gelů, které se pak aplikují přímo na postižené místo a případně i jeho okolí. Nevýhodou této formy aplikace je však to, že mast, resp. gel, a ani samotné postižené místo nejsou nijak chráněny proti vnějším vlivům, takže v/na masti/gelu mohou ulpívat nežádoucí biologické a/nebo mechanické nečistoty, a současně se z ní/něj může volně odpařovat

voda, v důsledku čehož může docházet ke změně jejích/jeho vlastností a ke změně uvolňovaného množství canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů. Kromě toho je mast/gel vystavena/vystaven nebezpečí nežádoucího náhodného otěru, takže po aplikaci je obvykle nutné nějakou dobu počkat, než se alespoň určitá část masti/gelu vsákne do kůže, a případný přebytek pak z kůže setřít. Při tomto postupu se však k/do místa požadovaného působení dostane nárazově pouze malé množství canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů, a nedosáhne se požadovaných dlouhodobých účinků.

Z tohoto důvodu je cílem vynálezu navrhnout vhodný kryt kůže pro krytí oblasti kůže s kožním problémem, např. ekzémem, apod. nebo kryt rány pro krytí rány (případně i pooperační), popáleniny, apod., který by obsahoval canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty a umožňoval jeho/jejich postupné a dlouhodobé uvolňování k/do místa požadovaného působení.

15 **Podstata vynálezu**

Cíle vynálezu se dosáhne krytem kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, jehož podstata spočívá v tom, že je tvořen nebo obsahuje vrstvu, která obsahuje nanovlákná a/nebo mikrovlákná biologicky kompatibilního polymeru/polymerů, která obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty uložený na povrchu a/nebo v materiálu nanovláken a/nebo mikrovláken.

Přitom je výhodné, pokud je biologicky kompatibilní polymer současně biologicky degradovatelný, takže se při použití krytu podle vynálezu rozpouští působením tělních tekutin nebo tělního prostředí, přičemž se z něj canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty postupně uvolňuje/uvolňují.

Ve složitější variantě krytu kůže nebo rány podle vynálezu je vrstva, která obsahuje nanovlákná a/nebo mikrovlákná biologicky kompatibilního polymeru, která obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty směrem ke kůži uživatele překrytá alespoň jednou pomocnou vrstvou prostupnou pro canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, nebo vytvořenou z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru, která do jisté míry řídí uvolňování canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů. Ve druhé variantě nemusí být pomocná vrstva

nutně vytvořená jako prostupná pro canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty jí pronikají až po jejím narušení tělními tekutinami.

Pro praktické použití kterékoliv varianty krytu kůže nebo rány podle
5 vynálezu je dále výhodné, pokud je vrstva, která obsahuje nanovlákná a/nebo mikrovlákná obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, uložená na nosné vrstvě, přičemž kterákoliv z vrstev krytu může být opatřena adhezivem pro připojení ke kůži uživatele.

V jiné variantě provedení krytu kůže nebo rány podle vynálezu je
10 canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty obsažen v jádru mikrovláken typu jádro-plášť, přičemž plášť těchto mikrovláken je vytvořený z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru, např. polymeru ze skupiny poly-ε-kaprolakton, polyvinylalkohol, kyselina mléčná, kopolymer polykaprolaktonu a kyseliny mléčné, kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny polyglykolové. V této
15 variantě umožňuje postupné rozpouštění pláště mikrovláken uvolňování canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů z jádra.

Kryt kůže nebo rány přitom může být vytvořen jako nebo může obsahovat vrstvu tvořenou pleteninou nebo tkaninou, která obsahuje přízi tvořenou polymerními nanovláknky, které ve svém materiálu obsahují canabidiol
20 a/nebo jeho derivát/deriváty, a/nebo může být vytvořen nebo může obsahovat pleteninou nebo tkaninu z jádrové příze, která ve svém plášti obsahuje polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná, které ve svém materiálu obsahují canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

Cíle vynálezu se dále dosáhne také polymerními nanovláknky a
25 polymerními mikrovláknky z biologicky kompatibilního polymeru, která mají ve své struktuře zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů. Případně polymerními mikrovláknky typu jádro-plášť, která mají molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů zakomponované ve
30 svém plášti a/nebo ve svém jádru, přičemž plášť těchto mikrovláken je s výhodou vytvořen z biologicky degradovatelného polymeru.

Kromě toho se cíle vynálezu dosáhne také směsí polymerních nanovláken a mikrovláken z biologicky kompatibilního polymeru/polymerů v libovolném poměru nanovláken a mikrovláken, u které mají polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná ve své struktuře zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

Cíle vynálezu se dále dosáhne také způsobem výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken, jehož podstata spořívá v tom, že se vytvoří roztok pro zvlákňování, který obsahuje 8 až 25 % alespoň jednoho biologicky kompatibilního polymeru nebo kopolymeru rozpuštěného v biologicky kompatibilním rozpouštědle a 0,1 až 25 % canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů rozpuštěného v etanolu, a z tohoto roztoku se elektrickým nebo odstředivým zvlákňováním vytvoří polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná, která mají ve své struktuře zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

Vhodným biologicky kompatibilním polymerem je přitom polymer ze skupiny poly- ϵ -kaprolakton, polyvinylalkohol, kyselina mléčná, kopolymer polykaprolaktonu a kyseliny mléčné, kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny polyglykolové.

Při použití poly- ϵ -kaprolaktonu pak roztok pro zvlákňování s výhodou obsahuje chloroform a etanol v objemovém poměru 7:3 až 9:1, s výhodou 8:2, canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:100 až 1:1, s výhodou 1:10, a 10 až 25 % hm. poly- ϵ -kaprolaktonu. Pro snížení průměrů vytvářených vláken může tento roztok dále obsahovat přídavek až 15 % obj. kyseliny mravenčí.

Při použití polyvinylalkoholu pak roztok pro zvlákňování s výhodou obsahuje 8 až 16 % polyvinylalkoholu rozpuštěného ve vodě a 0,1 až 15 % canabidiolu rozpuštěného v etanolu.

Vhodnou variantou elektrického zvlákňování je elektrické zvlákňování v elektrických polích, která se průběžně vytváří mezi alespoň jednou zvlákňovací elektrodou, na kterou se přivádí vysoké střídavé elektrické napětí, a ionty vzduchu/plynu v její blízkosti, neboť se při tomto způsobu elektrického

zvlákňování se dosahuje nejvyšší produktivity, a vytvářený útvar nanovláken je možné díky jeho specifické vnitřní struktuře dále mechanicky zpracovávat.

Další výhodou variantou elektrického zvlákňování je koaxiální elektrostatické zvlákňování, při kterém se z roztoku pro zvlákňování obsahujícího canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty vytváří jádro a/nebo plášť mikrovláken. Ve výhodné variantě provedení se plášť mikrovláken vytváří z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru, ze kterého se během jeho rozpouštění uvolňuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, nebo který svým rozpuštěním umožňuje uvolňování canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů z jádra mikrovláken typu jádro-plášť.

Jádro mikrovláken se přitom může vytvořit i z roztoku canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů nebo oleje obsahujícího canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

15 **Objasnění výkresů**

Na přiloženém výkrese je na obr. 1 SEM snímek směsi polymerních nanovláken a mikrovláken obsahujících canabidiol, vytvořených způsobem podle vynálezu v přiblížení 1000x, na obr. 2 SEM snímek směsi polymerních nanovláken a mikrovláken obsahujících canabidiol, vytvořených druhou variantou způsobu podle vynálezu v přiblížení 5000x, na obr. 3 SEM snímek směsi polymerních nanovláken a mikrovláken obsahujících canabidiol, vytvořených třetí variantou způsobu podle vynálezu v přiblížení 10000x, na obr. 4 SEM snímek polymerních nanovláken obsahujících canabidiol, vytvořených způsobem podle vynálezu v přiblížení 10000x, na obr. 5 SEM snímek polymerních nanovláken obsahujících canabidiol, vytvořených způsobem podle vynálezu v přiblížení 3000x, na obr. 6 SEM snímek polymerních nanovláken obsahujících canabidiol, vytvořených způsobem podle vynálezu v přiblížení 2000x, na obr. 7 SEM snímek polymerních nanovláken obsahujících canabidiol, vytvořených způsobem podle vynálezu v přiblížení 3000x, na obr. 8 schematicky znázorněn průřez krytem rány v jedné variantě jeho provedení, a na obr. 9 průřez krytem rány v druhé variantě provedení.

Příklady uskutečnění vynálezu

Kryt kůže pro krytí oblasti kůže s kožním problémem, např. zánětem, ekzémem, oparem, apod., nebo kryt rány pro překrytí rány (vč. pooperační), popáleniny, apod. podle vynálezu (obr. 8 a 9) je tvořen nebo obsahuje jako

5 jednu ze svých složek nanovlákn a/nebo mikrovlákn z biologicky kompatibilního a případně i biologicky degradovatelného polymeru, která mají ve své struktuře a/nebo na svém povrchu a/nebo ve svých mezivlákněných

10 prostorech zakomponovaný canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty. Tato polymerní nanovlákn a/nebo mikrovlákn přitom mohou být během své výroby zformována do plošné, nebo např. postupem dle PV CZ 2013-244 prostorově

tvárované vrstvy 1, která je s výhodou uložena na vhodné nosné vrstvě 2 - např. fólii, filmu, textilii (např. netkané textilii typu spunbond nebo meltblown, apod.), nebo přímo na některém ze v současnosti známých krytů kůže nebo

15 rány opatřeným adhezivem nebo bez něj, přičemž jsou orientovaná směrem ke kůži uživatele. Nosná vrstva 2 přitom poskytuje těmto polymerním nanovláknům a/nebo mikrovláknům požadované mechanické vlastnosti pro snadnou manipulaci s nimi, a současně je z vnější strany chrání před mechanickým

20 poškozením a případně i nežádoucím stržením z místa aplikace, přičemž však sama jejich stržení v případně potřeby s výhodou umožňuje. Polymerní nanovlákn a/nebo mikrovlákn s canabidiolem a/nebo jeho derivátem/deriváty mohou být v případě potřeby doplněna polymerními nanovlákn a/nebo

25 mikrovlákn s alespoň jednou jinou účinnou látkou, která působení canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů vhodně podporuje nebo doplňuje, nebo polymerními nanovlákn a/nebo mikrovlákn bez účinné látky. Tato polymerní nanovlákn a/nebo mikrovlákn jsou rozptýlena mezi nanovlákn a/nebo

30 mikrovlákn s canabidiolem a/nebo jeho derivátem/deriváty, a/nebo jsou ve formě vrstvy uložena na některém z povrchů vrstvy 1 těchto nanovláken a/nebo mikrovláken. Pro možnost řízeného uvolňování canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů k/do místa požadovaného působení může být vrstva 1 polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken ze strany přivrácené ke kůži

uživatele překryta alespoň jednou pomocnou vrstvou 3 prostupnou pro canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty. Tato pomocná vrstva 3 může být tvořena např. perforovanou fólií, filmem, textilní nebo netextilní mřížkou, nebo

- vrstvou polymerních nanovláken bez aktivní látky, případně s vhodnou aktivní látkou, vč. canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů. V jiné variantě provedení je pomocná vrstva 3 tvořená biologicky kompatibilním a současně biologicky degradovatelným polymerem, takže při použití krytu kůže nebo rány se tato
- 5 vrstva 3 působením tělních tekutin postupně rozpouští, čímž umožňuje do jisté míry řídit uvolňování canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů. V této variantě pak nemusí být pomocná vrstva 3 nutně vytvořená jako prostupná pro canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty jí pronikají až po jejím narušení.
- 10 Canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty se z povrchu polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken, a/nebo z jejich materiálu samovolně uvolňuje. V případě, kdy jsou nanovlákná a/nebo mikrovlákná vytvořena alespoň částečně z biologicky degradovatelného polymeru, dochází k uvolňování canabidiolu a/nebo jeho derivátu zejména v důsledku degradace, resp. alespoň
- 15 částečného rozpuštění nebo rozpadu nanovláken.
- Výhodou krytu kůže nebo rány podle vynálezu je, že je pružný a tvarovatelný podle povrchu části těla, na kterou se aplikuje, což umožňuje jeho dokonalý kontakt s kůží a velmi dobrý přestup canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů z polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken k/do místa
- 20 požadovaného působení, a současně i to, že jeho vrstva 1 polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken v podstatě uzavře místo požadovaného působení a případně i jeho okolí proti vnějším vlivům a vytvoří vhodné prostředí pro proces hojení, neboť je v podstatě neprůchozí pro většinu biologických nečistot (zejména bakterií) i mechanických nečistot (zejména prachu), avšak
- 25 současně průchozí pro vzdušný kyslík. Díky adhezivu nanosenému přímo na krytu kůže nebo rány podle vynálezu – na vrstvě 1 nanovláken a/nebo mikrovláken obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty a/nebo na nosné vrstvě 2, a/nebo díky dodatečnému překrytí tohoto krytu při jeho aplikaci prostředkem s vrstvou adheziva a/nebo jiným prvkem pro fixaci k místu
- 30 požadovaného působení je možné se s ním, na rozdíl od aplikace masti nebo gelu, ihned po aplikaci normálně pohybovat, bez nebezpečí jeho setření, přičemž canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty a případně i další aktivní látky se z něj mohou do místa požadovaného působení průběžně uvolňovat po delší

dobu, takže se rychleji dosáhne stejného nebo vyššího účinku jako při aplikaci masti/gelu, a tento účinek je dlouhodobější.

Způsob výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a potažmo i jedné varianty krytu kůže nebo rány podle vynálezu, pak spočívá v tom, že se nejprve vytvoří roztok pro zvlákňování, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, biologicky kompatibilní a případně i biologicky degradovatelný a pro lékařské účely vhodný polymer (s výhodou např. poly-ε-kaprolakton, polyvinylalkohol, kyselinu mléčnou, kopolymer polykaprolaktonu a kyseliny mléčné, kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny polyglykolové, apod. případně směs alespoň dvou z nich, nebo směs alespoň jednoho biologicky degradovatelného a alespoň jednoho biologicky nedegradovatelného polymeru), rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel (s výhodou např. směs chloroformu a etanolu), přičemž nezáleží na pořadí přidávání jednotlivých složek (může se např. smíchat předem připravený roztok biologicky kompatibilního polymeru v chloroformu s předem připraveným roztokem canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů v etanolu). Takto připravený roztok pro zvlákňování se následně zvlákňuje libovolným známým způsobem elektrického nebo odstředivého zvlákňování, přičemž se dle použité technologie, případně kombinace technologií, a jejího/jejich nastavení, vytváří buď pouze polymerní nanovlákná nebo polymerní mikrovlákná nebo směs polymerních nanovláken a mikrovláken, v jejichž polymeru jsou zakomponovány molekuly a/nebo slukly molekul, případně nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů. Nanovlákná a mikrovlákná přitom mohou být vytvořena ze stejného nebo z rozdílných polymerů.

Vhodným způsobem pro výrobu polymerních nanovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, je elektrostatické zvlákňování roztoku pro zvlákňování v elektrickém poli vytvořeném mezi alespoň jednou zvlákňovací elektrodou a alespoň jednou sběrnou elektrodou, na které se přivádí vysoké stejnosměrné napětí opačné polarity, nebo je jedna z nich uzemněná. Zvlákňovací elektroda přitom může být statická (tvořená např. jehlou, trubičkou, tryskou, nebo skupinou jehel, trubiček nebo trysek, lištou, strunou, apod.) nebo pohyblivá (tvořená např. rotujícím podlouhlým tělesem dle CZ 294274, diskem, spirálou, prstencem, atd., ve směru své délky se pohybující strunou dle CZ

300345, po kruhové dráze se pohybujícími strunami dle CZ 299549, převíjeným pásem dle CZ 2008-529, atd., přičemž se roztok pro zvlákňování zvlákňuje z povrchu této zvlákňovací elektrody, resp. jejího zvlákňovacího prvku/prvků). Při použití těchto technologií, které jsou komerčně dostupné pod označením 5 Nanospider™ (Elmarco) se dosahuje nejvyšší rovnoměrnosti vytvářené vrstvy 1 polymerních nanovláken.

Jiným vhodným způsobem pro výrobu takových nanovláken je např. elektrické zvlákňování dle CZ 304137, kdy se elektrické pole pro elektrické zvlákňování vytváří mezi zvlákňovací elektrodou, na kterou se přivádí vysoké střídavé napětí, a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými a/nebo přivedenými 10 do jejího okolí. Podle aktuální fáze střídavého napětí se pak na zvlákňovací elektrodě vytváří polymerní nanovlákná s opačným elektrickým nábojem a/nebo s úseky s opačným elektrickým nábojem, která po svém vzniku v důsledku působení elektrostatických sil vytváří objemový útvar, který se volně pohybuje 15 ve směru gradientu elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody. Dle teoretických srovnání dosahuje tato varianta až několikanásobně vyššího výkonu než varianty založené na použití vysokého stejnosměrného napětí. Při tomto způsobu elektrického zvlákňování se přitom vytváří objemový útvar nanovláken, který bezprostředně po opuštění zvlákňovací elektrody splňuje 20 definici aerogelu, tj. porézního ultralehkého materiálu. Díky pravidelné změně fáze a polarity střídavého napětí na zvlákňovací elektrodě přitom jednotlivá nanovlákná, nebo dokonce různé úseky jednotlivých nanovláken nesou různé elektrické náboje, v důsledku čehož se téměř ihned po svém vzniku působením elektrostatických sil shlukují do kompaktního objemového útvaru, ve kterém 25 polymerní nanovlákná pravidelně mění svůj směr a vytváří nepravidelnou mřížkovou strukturu vzájemně hustě provázaných nanovláken. Díky této struktuře dosahuje tento útvar podstatně lepších mechanických parametrů, než jiné útvary nanovláken, díky čemuž ho lze dále mechanicky zpracovávat standardními textilními technologiemi, např. je možné mu udělit zákrut a vytvořit 30 z něj přízi nebo nit. V CZ PV 2015-382 je pak popsán způsob vytváření jádrové příze s využitím objemového útvaru připraveného tímto způsobem elektrického zvlákňování, který se navíjí na vhodné jádro ve tvaru šroubovice.

- Při těchto postupech výroby je výhodné, pokud se polymerní nanovlákná již během své výroby nebo po ní ukládají na materiál, který bude následně sloužit jako nosná vrstva 2 připravovaného kožního krytu nebo krytu rány, neboť v takovém případě se obě vrstvy 1, 2 velmi dobře spojí přirozenou adhezí, obvykle bez nutnosti použití pojiva nebo dalších technologických kroků. Pokud je to však např. vzhledem k uvažovanému použití a/nebo charakteru a/nebo materiálu podkladu a/nebo polymerních nanovláken výhodné, je možné obě vrstvy 1, 2 (případně více vrstev tvořících kožní kryt nebo kryt rány) dodatečně pojit např. tavným nebo jiným lepidlem nebo jinak laminovat.
- 5
- 10 Z CZ 2009-797, resp. analogického EP2565302 a EP2504471 je dále známý způsob vytváření lineárních útvarů obsahujících jádro, na kterém je uložen plášť tvořený nanovláknami, který je k jádru fixován ovinem alespoň jednou krycí nití nebo tepelnou fixací. Z tohoto lineárního útvaru, resp. jádrové příze lze, stejně jako z jádrové příze dle CZ PV 2015-382, vytvořit kryt kůže nebo
- 15 rány, který bude tvořený, nebo který bude obsahovat vrstvu tvořenou pleteninou nebo tkaninou vytvořenou alespoň částečně z tohoto lineárního útvaru, u kterého je canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty uložen v materiálu nanovláken tvořících plášť jádrové příze.
- Vhodným způsobem pro výrobu mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty je pak elektrostatické zvlákňování z trysky/trysek, případně koaxiální elektrostatické zvlákňování z koaxiální trysky/trysek. Při jejich výrobě se pak vytváří mikrovlákná typu jádro-plášť, přičemž z roztoku pro zvlákňování obsahujícího canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty se vytváří jádro a/nebo plášť těchto mikrovláken. Ve variantě, kdy se z roztoku obsahujícího canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty vytváří jádro i plášť mikrovláken, může být obsah canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů v obou složkách mikrovláken stejný, nebo odlišný, např. může být v jádru mikrovláken větší. Plášť a jádro těchto mikrovláken přitom mohou být vytvořeny ze stejného, nebo naopak odlišného polymeru.
- 20
- 25
- 30 V případě, kdy se z roztoku pro zvlákňování obsahujícího canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty vytváří pouze jádro mikrovláken, je výhodné, pokud se jejich plášť vytváří z biologicky kompatibilního a současně biologicky degradovatelného polymeru, takže při použití krytu kůže nebo rány se tento

plášť působením tělních tekutin postupně rozpouští, čímž umožňuje do jisté míry řídit uvolňování canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů z mikrovláken.

V další variantě výroby mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty typu jádro-plášť se pro vytvoření pláště těchto mikrovláken
5 použije roztok pro zvlákňování biologicky kompatibilního a současně biologicky degradovatelného polymeru, který může ale nemusí obsahovat canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a pro vytvoření jádra těchto mikrovláken roztok canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů např. v alkoholu, nebo v jiném rozpouštědle, nebo jeho směs např. s vhodným olejem (např. olivovým). Při
10 tímto postupu se canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty uloží v jádře mikrovláken, přičemž při použití těchto mikrovláken nebo krytu kůže nebo rány, který je obsahuje, dojde k jeho uvolnění v důsledku degradace pláště mikrovláken působením tělních tekutin.

Při požadavku výroby směsi nanovláken a mikrovláken je pak možné
15 vhodným způsobem nastavit technologii pro výrobu nanovláken nebo mikrovláken, nebo tyto dvě technologie pro výrobu směsi s požadovaným podílem nanovláken a mikrovláken vhodným způsobem kombinovat – viz např. způsob výroby směsi nanovláken a mikrovláken dle CZ PV 2014-947, u kterého se vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláčky, do kterého se
20 zanášejí polymerní mikrovláčka vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo jinou technologií pro výrobu mikrovláken.

Kromě elektrického zvlákňování je možné pro výrobu polymerních nanovláken, mikrovláken nebo jejich směsi použít také odstředivé zvlákňování,
25 kdy se roztok pro zvlákňování, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty vytlačuje odstředivou silou z otvorů vytvořených v plášti rotujícího tělesa ve tvaru disku (např. ve smyslu DE 102005048939) nebo válce (např. ve smyslu JP 2008127726).

Dle řady experimentů se jako vhodné složení roztoku pro všechny typy
30 zvlákňování jeví složení, kdy tento roztok obsahuje chloroform a etanol v objemovém poměru 7:3 až 9:1, s výhodou 8:2, přičemž může dále obsahovat až 15 % obj. kyseliny mravenčí, která svou přítomností způsobuje vytváření

nanovláken s menším průměrem, canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:100 až 1:1, s výhodou 1:10, a podíl polymeru dle jeho molekulární hmotnosti 10 až 25 % hm, přičemž se s výhodou nejprve rozpustí canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty v etanolu a do takto
5 vytvořeného roztoku se poté přidá chloroform a poté daný polymer/polymery, případně kopolymer. V případě potřeby může roztok pro zvlákňování obsahovat další pomocné složky, např. složky, které zvyšují jeho elektrickou vodivost a/nebo snižují jeho viskozitu, čímž zvyšují jeho ochotu vytvářet nanovlákn
a/nebo mikrovlákn, jako např. NaCl, tetrahydrofuran, anion či kation aktivní
10 tenzid/tenzidy, apod.

Další výhodné složení roztoku pro všechny typy zvlákňování je složení, kdy tento roztok obsahuje 8 až 16 % polyvinylalkoholu rozpuštěného ve vodě a 0,1 až 15 % canabidiolu rozpuštěného v etanolu. I v tomto případě je možné tento roztok doplnit pomocnou složkou/složkami uvedenými výše.

15 V jiných variantách provedení krytu kůže nebo rány podle vynálezu je canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty uložený na povrchu polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken z biologicky kompatibilního polymeru (které mohou, ale nemusí obsahovat canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty ve své struktuře), kam se nanese např. ve formě disperze nebo roztoku např. v lázni,
20 promýváním, nástřikem, impregnací, nebo povlakováním, apod.

Minimální množství canabidiolu v polymerních nanovlákních a/nebo mikrovlákních ve všech variantách provedení pro dosažení léčivého účinku je 0,1 % hm.

Níže jsou pro názornost popsány konkrétní příklad výroby polymerních
25 nanovláken a mikrovláken, které obsahují canabidiol zakomponovaný ve své struktuře, a na obr. 1 až 7 jejich SEM snímky.

Příklad 1

Smícháním chloroformu a etanolu v objemovém poměru 8:2 s
30 canabidiolem v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:10 a poly-ε-kaprolaktonu s molekulární hmotností 45000 se vytvořil roztok pro zvlákňování, který obsahoval 16 % hm. poly-ε-kaprolaktonu. Tento roztok se poté zvlákňoval

elektrostatickým zvlákňováním z povrchu testovací zvlákňovací elektrody tvořené elektricky vodivým hrotem, na kterou se přivádělo napětí +18 kV, a proti které byl uspořádán uzemněný kolektor pro uložení vytvářených vláken. Zvlákňování probíhalo v atmosféře vzduchu s relativní vlhkostí 56 % a teplotou
5 23 °C.

Tímto způsobem se vytvořila směs polymerních nanovláken a mikrovláken, přičemž nanovlákná i mikrovlákná ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu, jejíž SEM snímek je na obr. 1.

10

Příklad 2

Smícháním chloroformu a etanolu v objemovém poměru 8:2, canabidiolu v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:10 a poly-ε-kaprolaktonu o molekulové hmotnosti 45000 se vytvořil roztok pro zvlákňování, který obsahoval 16 % hm
15 poly-ε-kaprolaktonu. Ten se poté zvlákňoval elektrostatickým zvlákňováním z povrchu zvlákňovacích prvků ve tvaru struny dle CZ 300345, na které se přivádělo napětí – 35 kV, proti kterým byla uspořádaná sběrná elektroda tvořená strunou, na kterou se přivádělo napětí + 18 kV. Zvlákňování probíhalo v atmosféře vzduchu s relativní vlhkostí 50 % při teplotě 21 °C. Vytvářená
20 vlákna se přitom ukládala na podklad tvořený netkanou textilií, který byl z prostoru zvlákňování odtahován rychlostí 20 mm/min.

Tímto způsobem se vytvořila směs polymerních nanovláken a mikrovláken, přičemž nanovlákná i mikrovlákná ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu, jejíž SEM snímek je na
25 obr. 2.

Příklad 3

Při koaxiálním zvlákňování se do vnější štěrbiny trysky pro koaxiální zvlákňování dával roztok poly-ε-kaprolaktonu ve směsi chloroformu a
30 etanolu (9:1), s obsahem poly-ε-kaprolaktonu 16 % hm., a do její střední štěrbiny se dával olivový olej obsahující 2,3 % canabidiolu, přičemž poměr

materiálu dávkovaného do vnější a vnitřní šterbiny byl 2:1. Na trysku se přitom přivádělo napětí + 15 kV, na kolektor tvořený elektricky vodivou deskou vzdálenou od ní 150 mm napětí – 30 kV, přičemž zvlákňování probíhalo v atmosféře vzduchu s relativní vlhkostí 34 % při teplotě 22 °C.

- 5 Tímto způsobem se vytvořila směs polymerních nanovláken a mikrovláken, přičemž nanovlákná i mikrovlákná ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu, jejíž SEM snímek je na obr. 3.

10 **Příklad 4**

- Smícháním chloroformu, etanolu a kyseliny mravenčí v objemovém poměru 8:1:1, canabidiolu v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:10 a poly-ε-kaprolaktonu o molekulové hmotnosti 45000 se vytvořil roztok pro zvlákňování, který obsahoval 10 % hm poly-ε-kaprolaktonu. Tento roztok se zvlákňoval
15 stejně jako roztok v příkladu 2. Tímto způsobem se vytvořila polymerní nanovlákná, která ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu, jejichž SEM snímek je na obr. 4.

Příklad 5

- 20 Smícháním chloroformu, etanolu a kyseliny mravenčí v objemovém poměru 8:1:1, canabidiolu v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:10 a poly-ε-kaprolaktonu o molekulové hmotnosti 45000 se vytvořil roztok pro zvlákňování, který obsahoval 15 % hm poly-ε-kaprolaktonu. Tento roztok se zvlákňoval
stejně jako roztok v příkladu 2. Tímto způsobem se vytvořila polymerní
25 nanovlákná, která ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu, jejichž SEM snímek je na obr. 5.

Příklad 6

- 30 Smícháním chloroformu, etanolu a kyseliny mravenčí v objemovém poměru 8:1:1, canabidiolu v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:10 a poly-ε-kaprolaktonu o molekulové hmotnosti 45000 se vytvořil roztok pro zvlákňování,

který obsahoval 20 % hm poly- ϵ -kaprolaktonu. Tento roztok se zvlákňoval stejně jako roztok v příkladu 2. Tímto způsobem se vytvořila polymerní nanovlákná, která ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu, jejichž SEM snímek je na obr. 6.

5

Příklad 7

Smícháním chloroformu, etanolu a kyseliny mravenčí v objemovém poměru 8:1:1, canabidiolu v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:10 a poly- ϵ -kaprolaktonu o molekulové hmotnosti 45000 se vytvořil roztok pro zvlákňování, který obsahoval 25 % hm poly- ϵ -kaprolaktonu. Tento roztok se zvlákňoval stejně jako roztok v příkladu 2. Tímto způsobem se vytvořila polymerní nanovlákná, která ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu, jejichž SEM snímek je na obr. 7.

15 **Příklad 8**

Do 10,3 g 12% vodného roztoku polyvinylalkoholu se přidalo 1,1 g 50% roztoku canabidiolu v etanolu. Takto vytvořený roztok pro zvlákňování se následně zvlákňoval stejným způsobem jako v příkladu 1, čímž se vytvořila směs nanovláken a mikrovláken, přičemž nanovlákná i mikrovlákná ve svém materiálu obsahovala molekuly, shluky molekul a nanočástice canabidiolu.

20

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kryt kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, **vyznačující se tím**, že je tvořen, nebo obsahuje vrstvu (1),
5 která obsahuje nanovlákná a/nebo mikrovlákná biologicky kompatibilního polymeru/polymerů, která obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty uložený na povrchu a/nebo v materiálu nanovláken a/nebo mikrovláken.
2. Kryt kůže nebo rány podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že biologicky kompatibilní polymer je současně biologicky degradovatelný.
- 10 3. Kryt kůže nebo rány podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vrstva (1) obsahující nanovlákná a/nebo mikrovlákná biologicky kompatibilního polymeru, která obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, je směrem ke kůži uživatele překrytá alespoň jednou pomocnou vrstvou (3) prostupnou pro canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, nebo pomocnou vrstvou (3) vytvořenou
15 z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru.
4. Kryt kůže nebo rány podle nároku 1 nebo 3, **vyznačující se tím**, že vrstva (1) obsahující nanovlákná a/nebo mikrovlákná obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty je z vnější strany opatřena nosnou vrstvou (2).
5. Kryt kůže nebo rány podle libovolného z nároků 1, 3 nebo 4,
20 **vyznačující se tím**, že vrstva (1) obsahující nanovlákná a/nebo mikrovlákná obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a/nebo nosná vrstva (2), je opatřena adhezivem pro připojení ke kůži uživatele.
6. Kryt kůže nebo rány podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že canabidiol a/nebo jeho deriváty je obsažen v jádru mikrovláken typu jádro-plášť, přičemž
25 plášť těchto mikrovláken je vytvořený z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru.
7. Kryt kůže nebo rány podle libovolného z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že biologicky kompatibilním polymerem je polymer ze skupiny poly-ε-kaprolakton, polyvinylalkohol, kyselina mléčná, kopolymer

polykaprolaktonu a kyseliny mléčné, kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny polyglykolové.

8. Kryt kůže nebo rány podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** je tvořený, nebo obsahuje pleteninu nebo tkaninu, která obsahuje přízi tvořenou
5 polymerními nanovlákný a/nebo mikrovlákný, která ve svém materiálu obsahují canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

9. Kryt kůže nebo rány podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** je tvořený, nebo obsahuje pleteninu nebo tkaninu, která obsahuje jádrovou přízi, která obsahuje plášť, který obsahuje polymerní nanovlákná, která ve svém materiálu
10 obsahují canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

10. Polymerní nanovlákná z biologicky kompatibilního polymeru, **vyznačující se tím, že** mají ve své struktuře zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

11. Polymerní mikrovlákná z biologicky kompatibilního polymeru, **vyznačující se tím, že** mají ve své struktuře zakomponované molekuly a/nebo
15 shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

12. Polymerní mikrovlákná typu jádro-plášť z biologicky kompatibilního polymeru/polymerů, **vyznačující se tím, že** mají ve svém plášti a/nebo ve svém jádru zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice
20 canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

13. Polymerní mikrovlákná typu jádro-plášť z biologicky kompatibilního polymeru/polymerů podle nároku 12, **vyznačující se tím, že** jejich plášť je tvořen biologicky degradovatelným polymerem nebo směsí nebo kopolymerem dvou takových polymerů.

25 14. Směs polymerních nanovláken a mikrovláken z biologicky kompatibilního polymeru/polymerů, **vyznačující se tím, že** polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná mají ve své struktuře zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

15. Způsob výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken, **vyznačující se tím, že** se vytvoří roztok pro zvlákňování, který obsahuje alespoň jeden biologicky kompatibilní polymer nebo kopolymer rozpuštěný v biologicky kompatibilním rozpouštědle a 0,1 až 25 % canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů rozpuštěného v etanolu, a z tohoto roztoku se elektrickým nebo odstředivým zvlákňováním vytvoří polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná, která mají ve svém struktuře zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

16. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím, že** biologicky kompatibilním polymerem je polymer ze skupiny poly-ε-kaprolakton, polyvinylalkohol, kyselina mléčná, kopolymer polykaprolaktonu a kyseliny mléčné, kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny polyglykolové.

17. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím, že** roztok pro zvlákňování obsahuje chloroform a etanol v objemovém poměru 7:3 až 9:1, canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:100 až 1:1, a 10 až 25 % hm. poly-ε-kaprolaktonu, a z tohoto roztoku se elektrickým nebo odstředivým zvlákňováním vytvoří polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná, která mají ve svém struktuře zakomponované molekuly a/nebo shluky molekul a/nebo nanočástice canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů.

18. Způsob podle nároku 17, **vyznačující se tím, že** roztok pro zvlákňování, obsahuje chloroform a etanol v objemovém poměru 8:2 a canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty v hmotnostním poměru vůči etanolu 1:10.

19. Způsob podle nároku 17 nebo 18, **vyznačující se tím, že** roztok pro zvlákňování dále obsahuje až 15 % obj. kyseliny mravenčí.

20. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím, že** roztok pro zvlákňování obsahuje 8 až 16 % polyvinylalkoholu rozpuštěného ve vodě a 0,1 až 15 % canabidiolu rozpuštěného v etanolu.

21. Způsob podle libovolného z nároků 15 až 20, **vyznačující se tím, že** roztok pro zvlákňování se zvlákňuje elektrickým zvlákňováním v elektrických polích, která se průběžně vytváří mezi alespoň jednou zvlákňovací elektrodou, na kterou se přivádí vysoké střídavé elektrické napětí, a ionty vzduchu/plynu
5 v její blízkosti.

22. Způsob podle libovolného z nároků 15 až 20, **vyznačující se tím, že** roztok pro zvlákňování se zvlákňuje koaxiálním elektrostatickým zvlákňováním, přičemž z roztoku pro zvlákňování obsahujícího canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty se vytváří jádro a/nebo plášť mikrovláken.

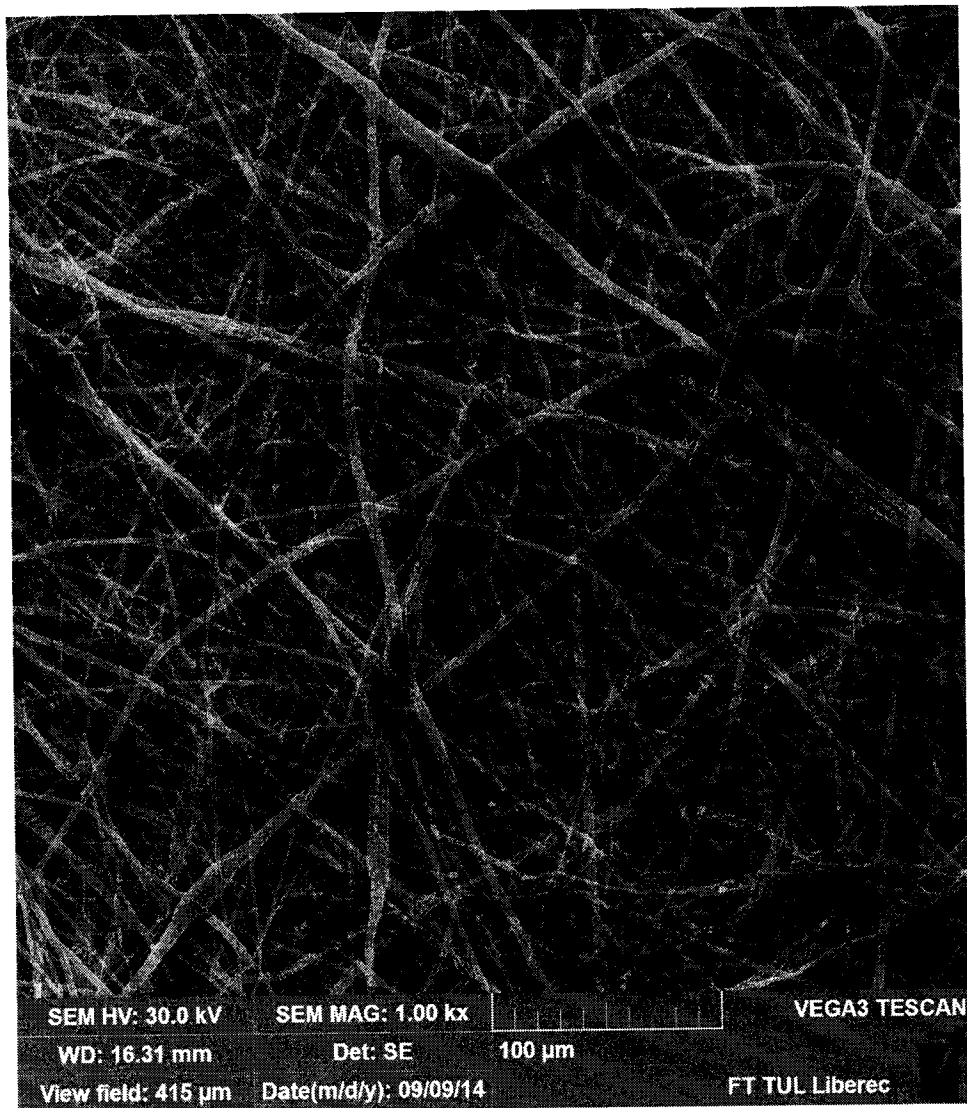
10 23. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím, že** plášť mikrovláken se vytváří z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru.

22. Způsob podle nároku 18, **vyznačující se tím, že** polymerní mikrovlákná obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty se vytváří koaxiálním elektrostatickým zvlákňováním, při kterém se plášť mikrovláken
15 vytváří z roztoku biologicky kompatibilního a biologicky degradabilního polymeru, a jádro těchto mikrovláken se vytváří z roztoku canabidiolu a/nebo jeho derivátu/derivátů nebo oleje obsahujícího canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty.

16.06.15

2075-408

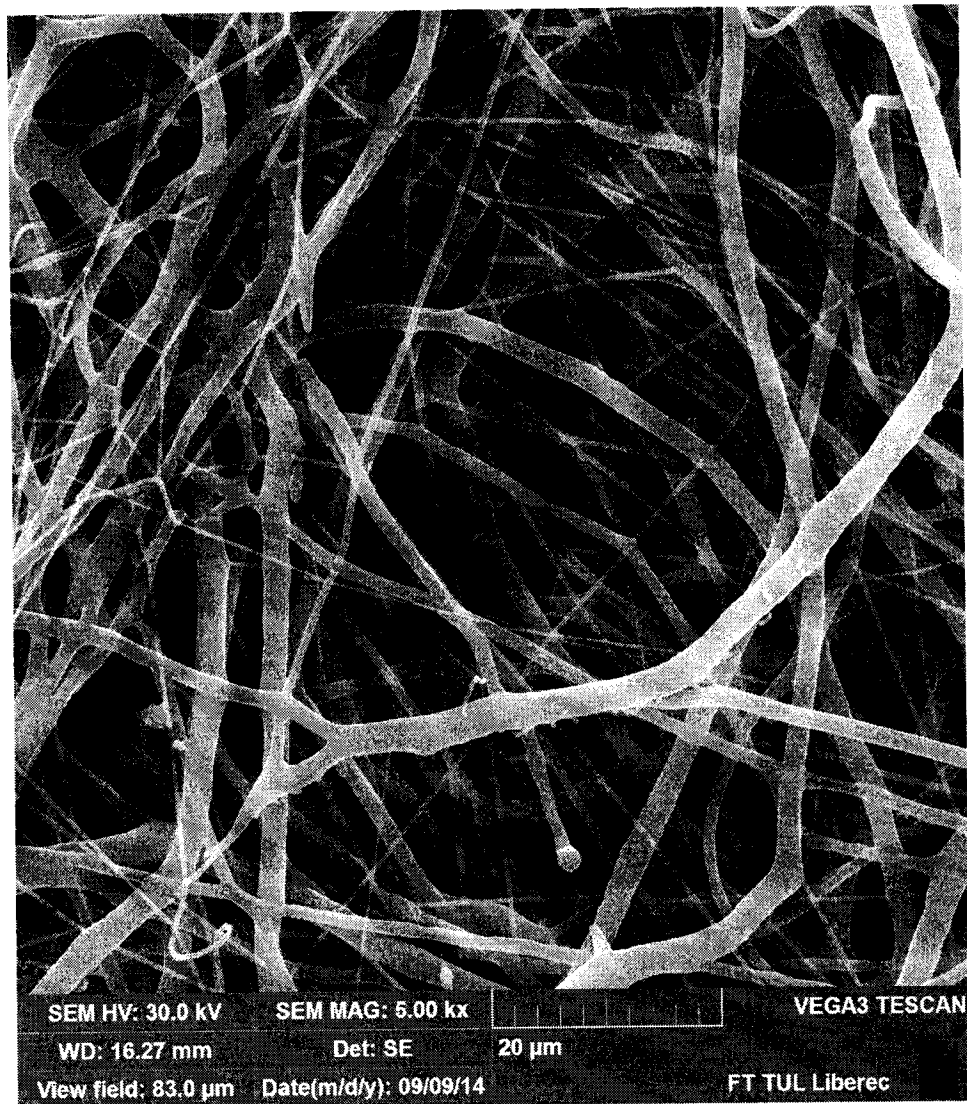
1/7



Obr. 1

16.05.13

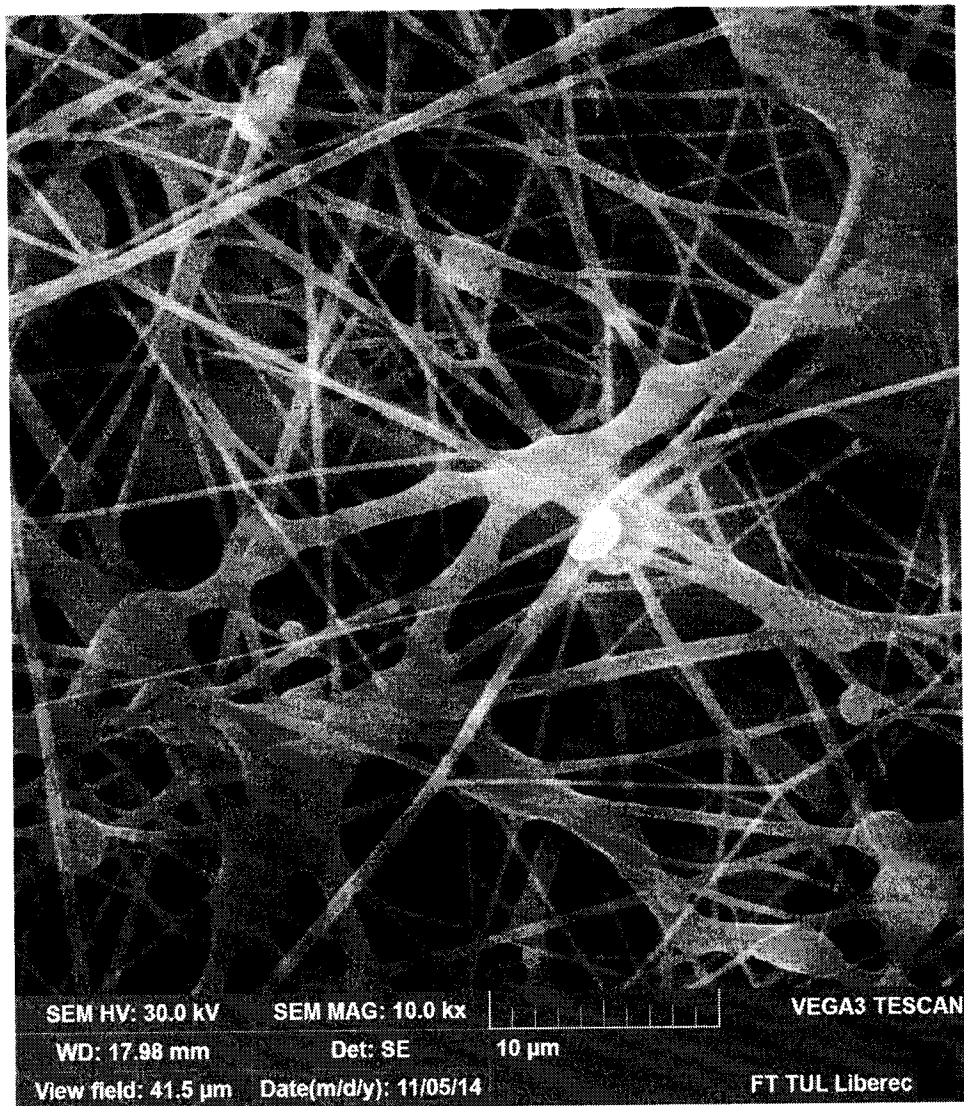
2/7



Obr. 2

16.06.15

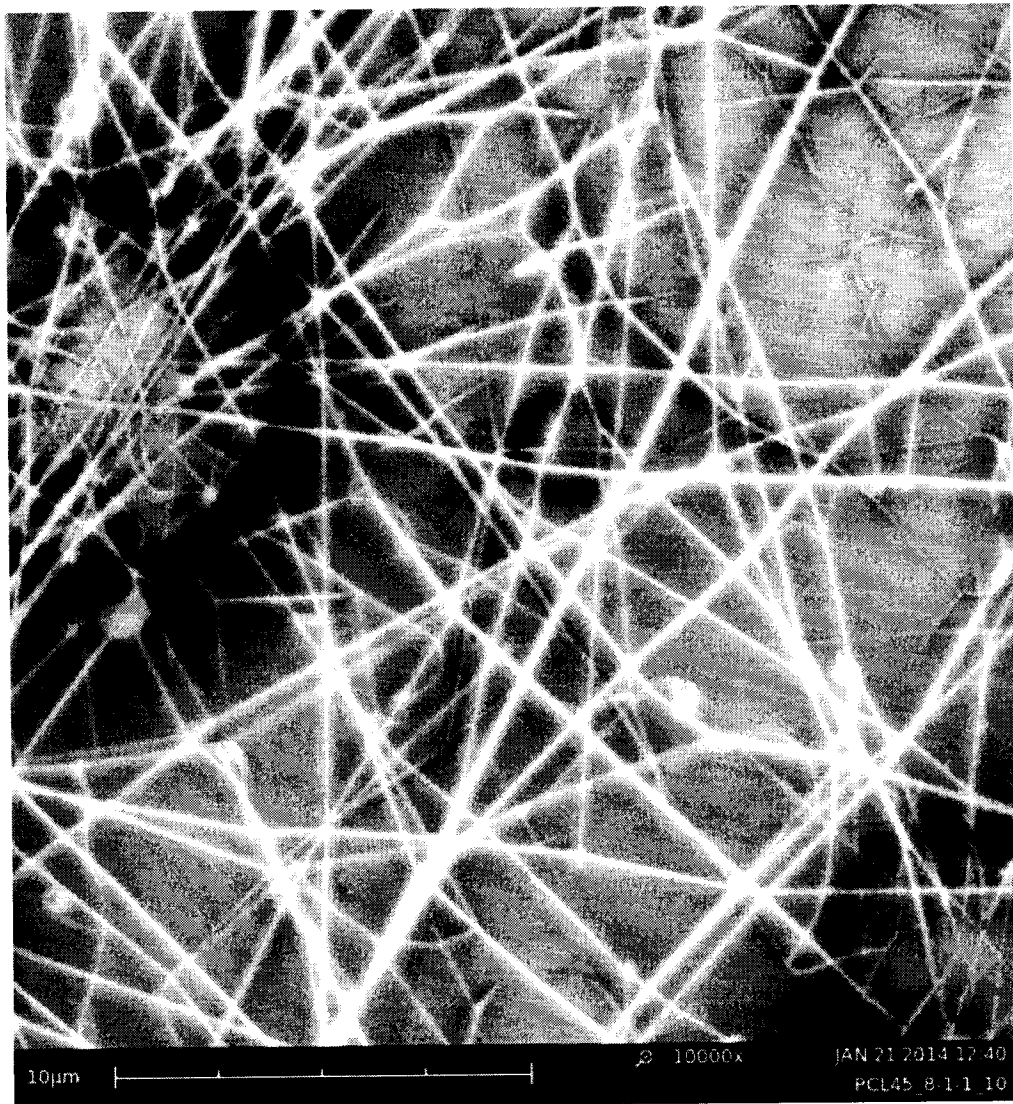
3/7



Obr. 3

16.06.15

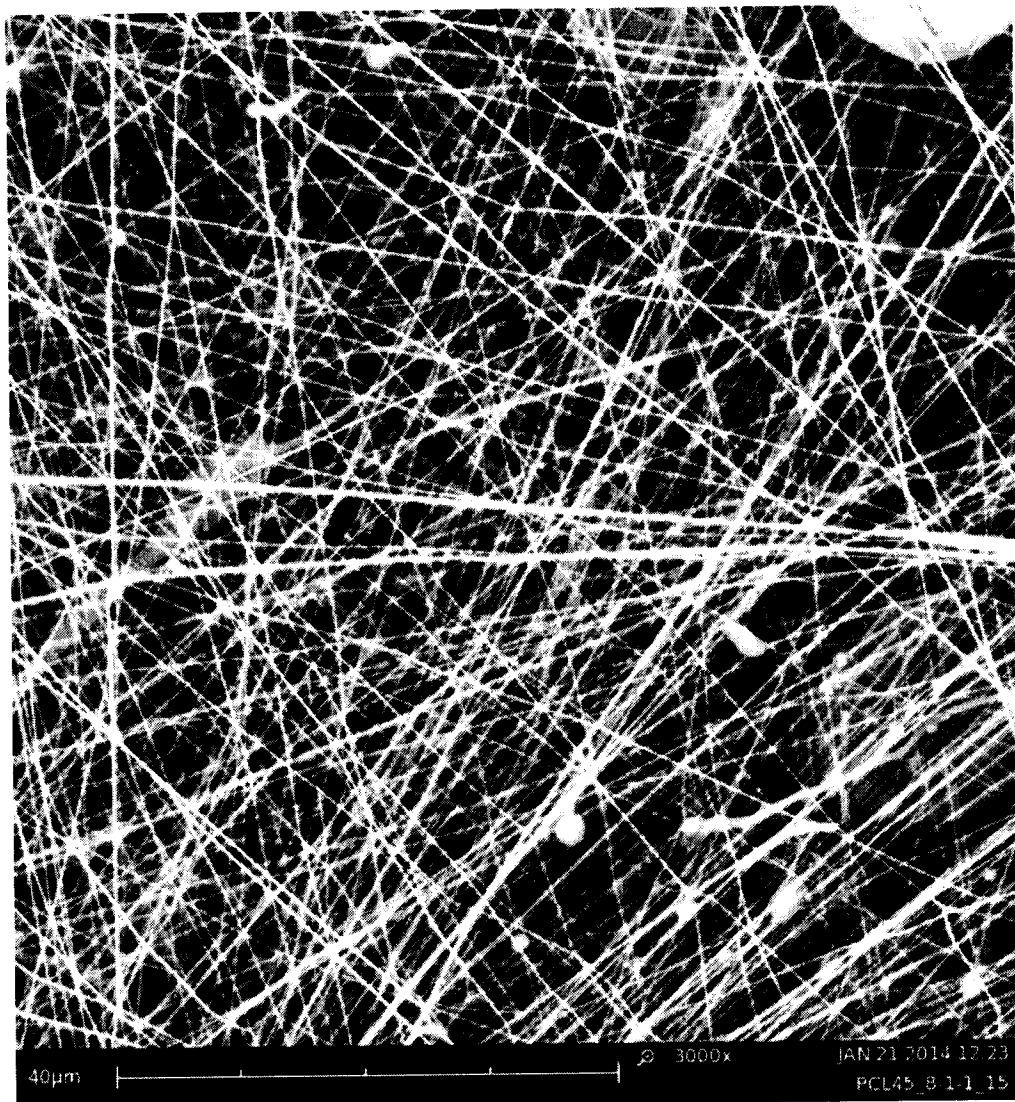
4/7



Obr. 4

16.08.15

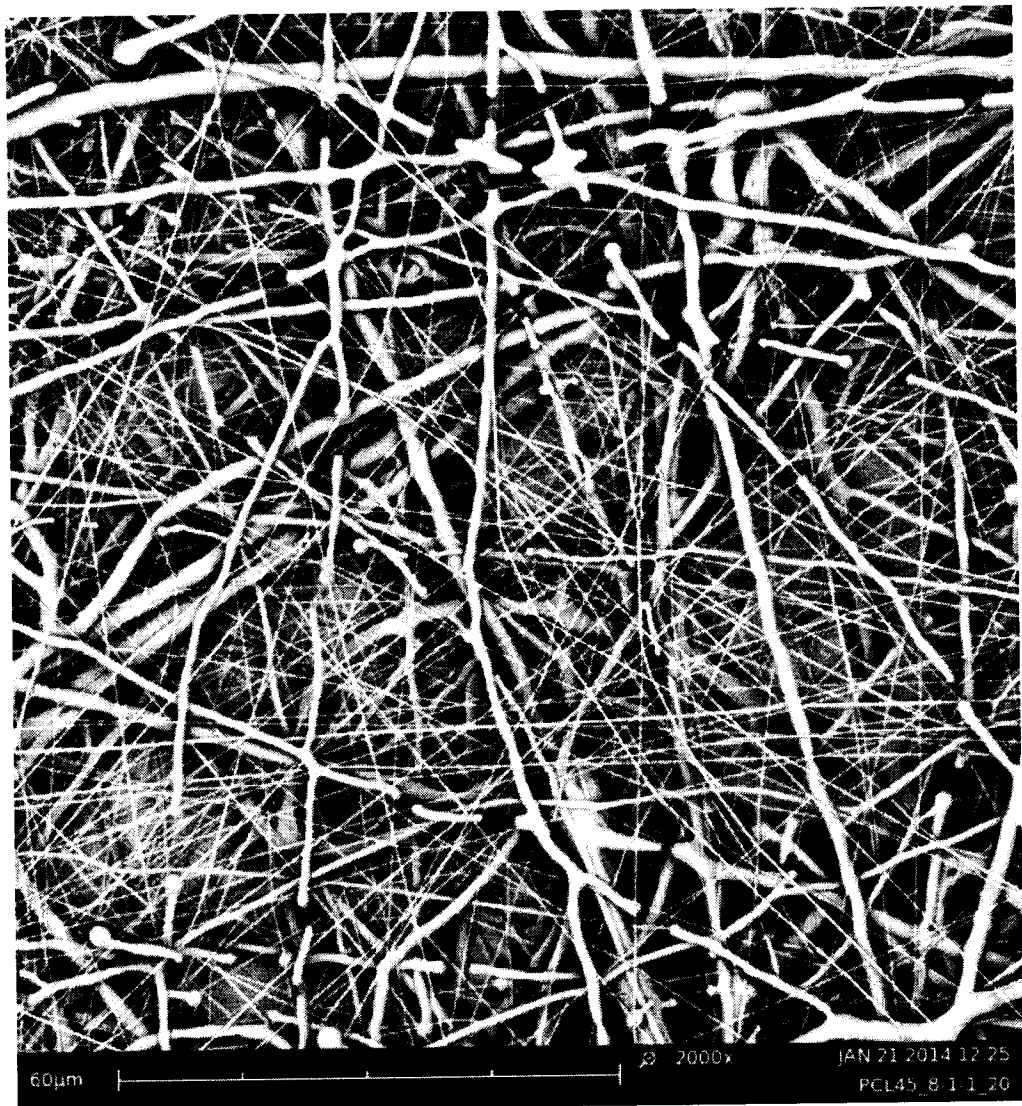
5/7



Obr. 5

16.08.15

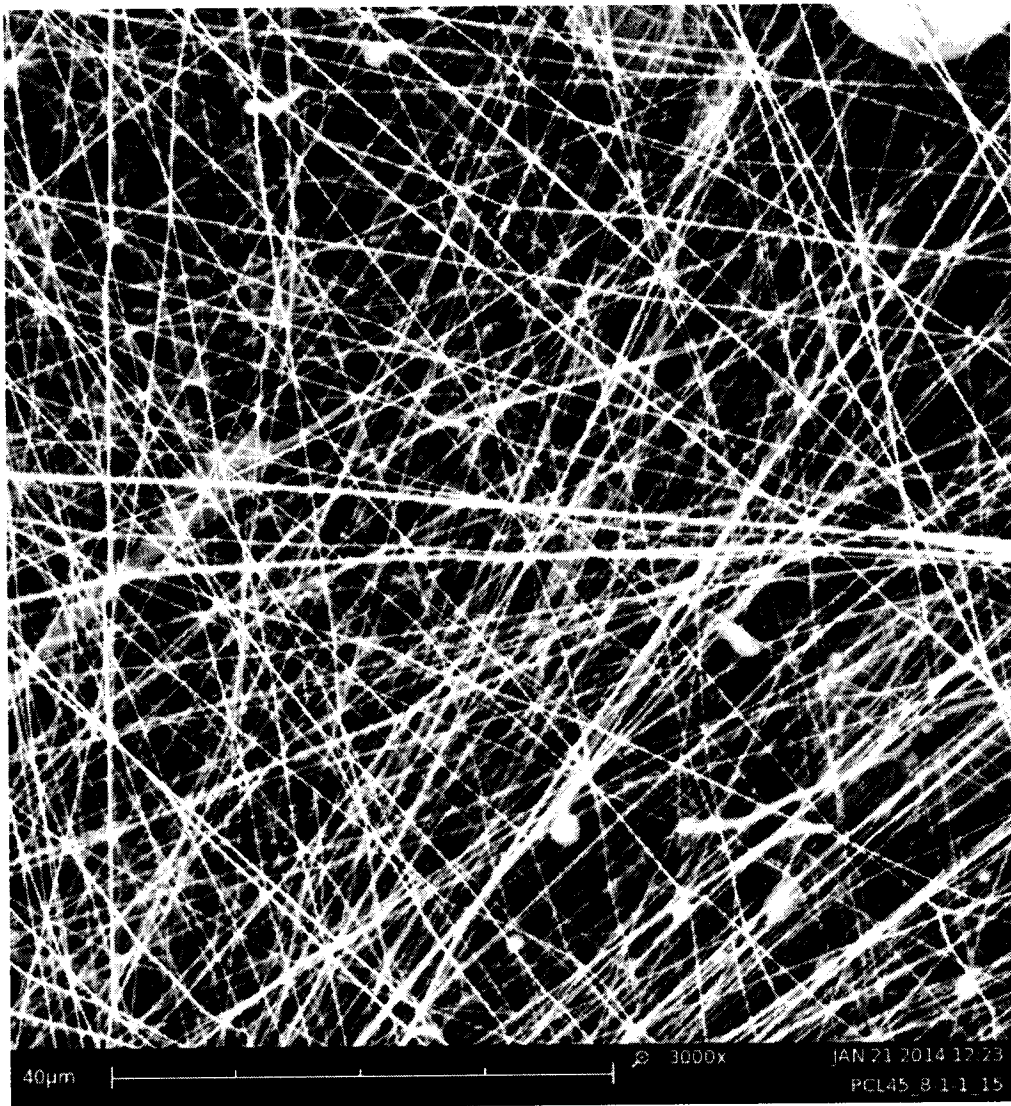
6/7



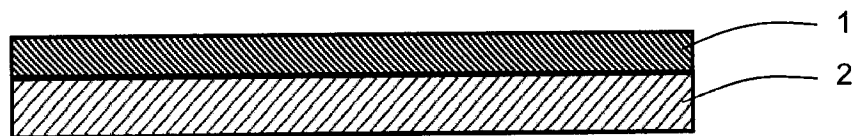
Obr. 6

16.06.15

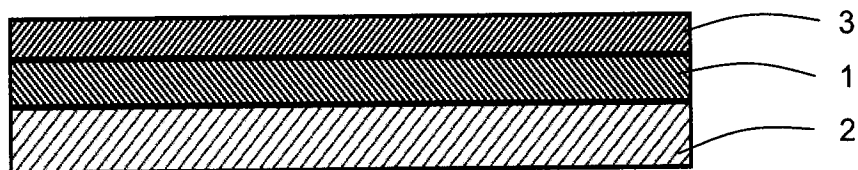
7/7



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

Příloha č. 6

Erben, Jakub; Jencova, Vera; Chvojka, Jiri; et al.: The combination of meltblown technology and electrospinning - The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability, MATERIALS LETTERS Volume: 173 Pages: 153-157 Published: JUN 15 2016 (IF 2,572)

Patent: Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná.



The combination of meltblown technology and electrospinning – The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability



Jakub Erben*, Vera Jencova, Jiri Chvojka, Lenka Blazkova, Katerina Strnadova, Miroslav Modrak, Eva Kuzelova Kostakova

Technical University of Liberec, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2015

Received in revised form

3 February 2016

Accepted 27 February 2016

Available online 2 March 2016

Keywords:

Meltblown technology

Electrospinning

Scaffold

Nanofibers

Tissue engineering

Polycaprolactone

ABSTRACT

This study describes the production, testing and characterization of biodegradable scaffolds for bone tissue, which consist of the exact ratio of meltblown microfibers and nanofibers produced through the electrostatic field. All fibrous materials were produced from polycaprolactone. Three kinds of materials were prepared in the experiment with the same area density and with different well-defined ratio of microfibers as a mechanical component and nanofibers as a cells adherent component. All prepared materials showed optimum porosity of the inner structure for cell proliferation and in comparison to the materials with nanofibers they had good mechanical properties. Important structural properties and homogeneity of each material were observed by electron microscopy and analyzed by image analysis. The effect of various ratios of microfibers and nanofibers on adhesion and proliferation of osteoblasts *in-vitro* was characterized.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrospinning is a technology used for the production of polymer nanofibrous materials from polymer solutions or melts. This technique is thoroughly described in literature [1] and the nanofibrous materials prepared by electrospinning are suitable for tissue engineering as scaffolds [1,2]. The structure of nanofibrous mats is appropriate for cell adhesion and proliferation [2–4]. However, mechanical properties of these mats are often not adequate. The mechanical properties can be improved by a combination of electrospinning with another nonwoven technology which produces microfibers, typically 1–7 μm in diameter [6]. The meltblown technology produces fibers from polymer melt by extrusion through a die with small orifices [5].

This article is based on our previous research [7], where the basic development of the first composite materials for bone tissue engineering had been presented. These materials consist of nanofibers and microfibers with confirmed mechanical functionality and with excellent performance properties for cell proliferation [8–10]. The aim of this follow-up study is to describe the rate of cell viability, depending on the ratio of micro and nanofibers in the composite. The results have shown that the cell viability increases with the increasing content of nanofibers in the composite while

maintaining the required structural properties. Based on the obtained results we can therefore determine the critical value of the smallest possible content of nanofibers in the composite. On the other hand, the composite shows mechanical instability beyond this critical value of nanofibers.

2. Experimental part

2.1. Materials

Poly- ϵ -caprolactone (PCL; Mw 45,000; Sigma Aldrich), absolute ethanol (Penta Chemicals) and chloroform (Penta Chemicals) were used for the composite materials production.

2.2. Scaffold fabrication

Solution of 16 wt% polycaprolactone (PCL) in chloroform/ethanol (9:1) was prepared for the electrospinning process. The scheme of the production equipment set-up in optimal conditions is shown in Fig. 1. The set-up was composed of a meltblown device (J&M Laboratories), an electrospinning device (a multi needle spinner and a countervailing pressure cylinder) and computer-controlled pumps. The meltblown extruder screw rotated at 3–15 rpm for 30–120 min, respectively (depending on the ratio of micro- and nanofibers in the sample). 100 g of polymer per sample was always extruded. Air velocity was 20 ms^{-1} at 200 mm from a

* Corresponding author.

E-mail address: erben.jakub@gmail.com (J. Erben).

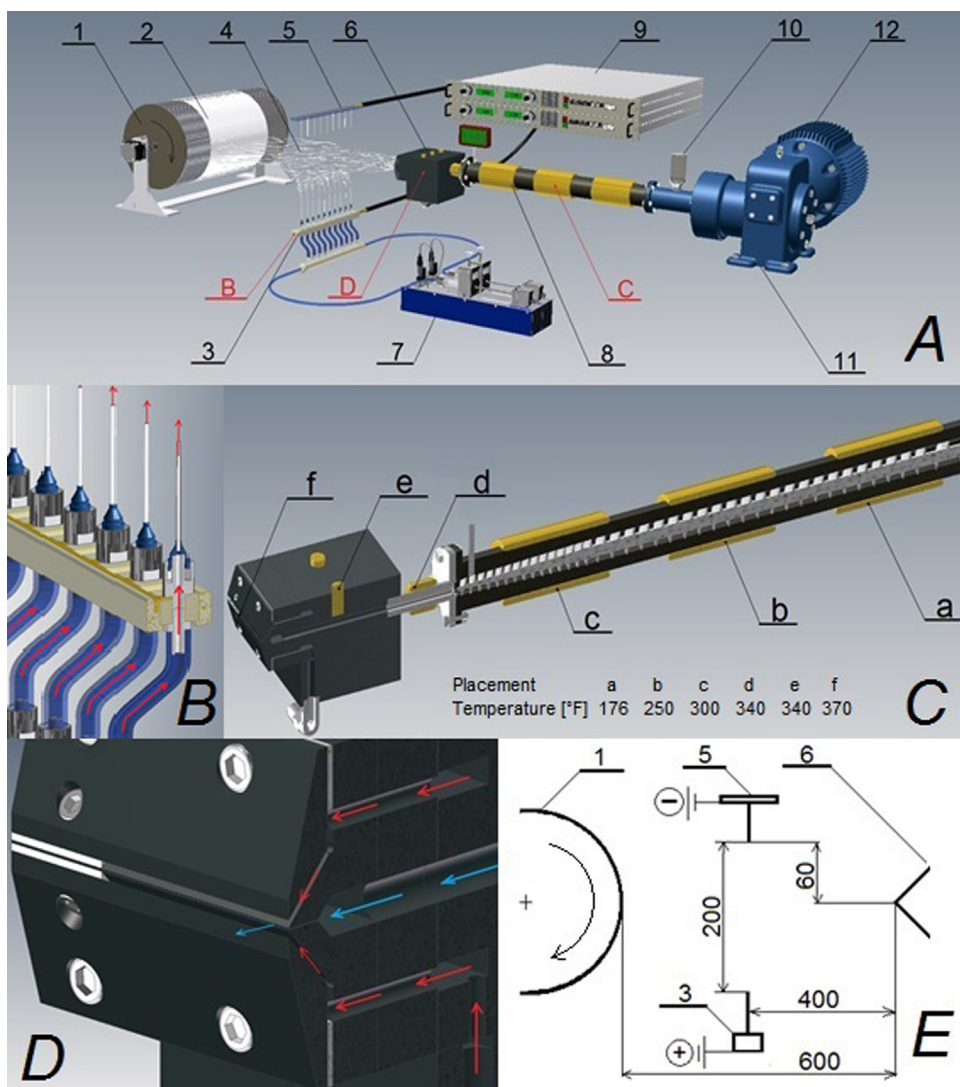


Fig. 1. The scheme of the combination of meltblown technology and electrospinning: the scheme of the overall set-up (A); detail of the multi needle spinning electrode (B); the meltblown die and extruder with heating zones – the optimal temperature set-up (C); the detail of meltblown die (D); the device proportion description in millimeters (E).

meltblown die. The meltblown die length was 100 mm. The needle spinner had adjustable spacing and a number of needles. There were 10 needles with a diameter of 1.2 mm with the spacing of 25 mm. The polymer dosage was 70 ml/h. The spinner was charged up to 35 kV positive and the collector 20 kV negative. Fibers were deposited on an intercepting drum collector which rotated at 4 rpm. The study compares three materials containing nanofibers with the numerical ratio in the composite: 1) 26% (ME26); 2) 55% (ME55); 3) 71% (ME71). The ratio represents the number of nanofibers relative to the total number of all fibers (micro and nano). The ratio was calculated from three SEM images for each sample. The ratio of micro and nanofibers in the composite was only influenced by changing the meltblown extruder rotation speed. Production and structural variables for all three created samples are shown in Fig. 2. During all experiments, the ambient temperature and relative humidity were set to 23 °C; 45%.

A: 1 – drum collector, 2 – composite fiber layer, 3 – multi needle spinner, 4 – airstream with fibers, 5 – needle collector, 6 – meltblown die, 7 – pumps, 8 – extruder, 9 – high voltage sources, 10 – hopper, 11 – transmission, 12 – engine.

2.3. Morphology characterization

The dry samples were sputter coated with gold (5 nm) and observed by a scanning electron microscope (SEM, Tescan Vega 3SB). The biocompatibility of the material, cell proliferation and ability of the cells to migrate into the structure of scaffold were tested *in-vitro* by means of MG-63 osteoblasts.

2.4. In-vitro testing of MG-63 osteoblasts

Human osteoblasts–MG63 (ATCC) were maintained in EMEM (ATCC) with 10% (v/v) FBS (Lonza) and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (Lonza). The cells were cultivated in the incubator (37 °C/5% CO₂). The medium was changed 3 times a week. The second passage culture was used for the experiments.

2.5. Sample preparation, cell seeding

The discs of a diameter of 15 mm and thickness of 5 mm were cut from prepared layers. Discs were sterilized (70% ethanol, 30 min) and washed in PBS (pH 7.4) prior to the cell seeding.

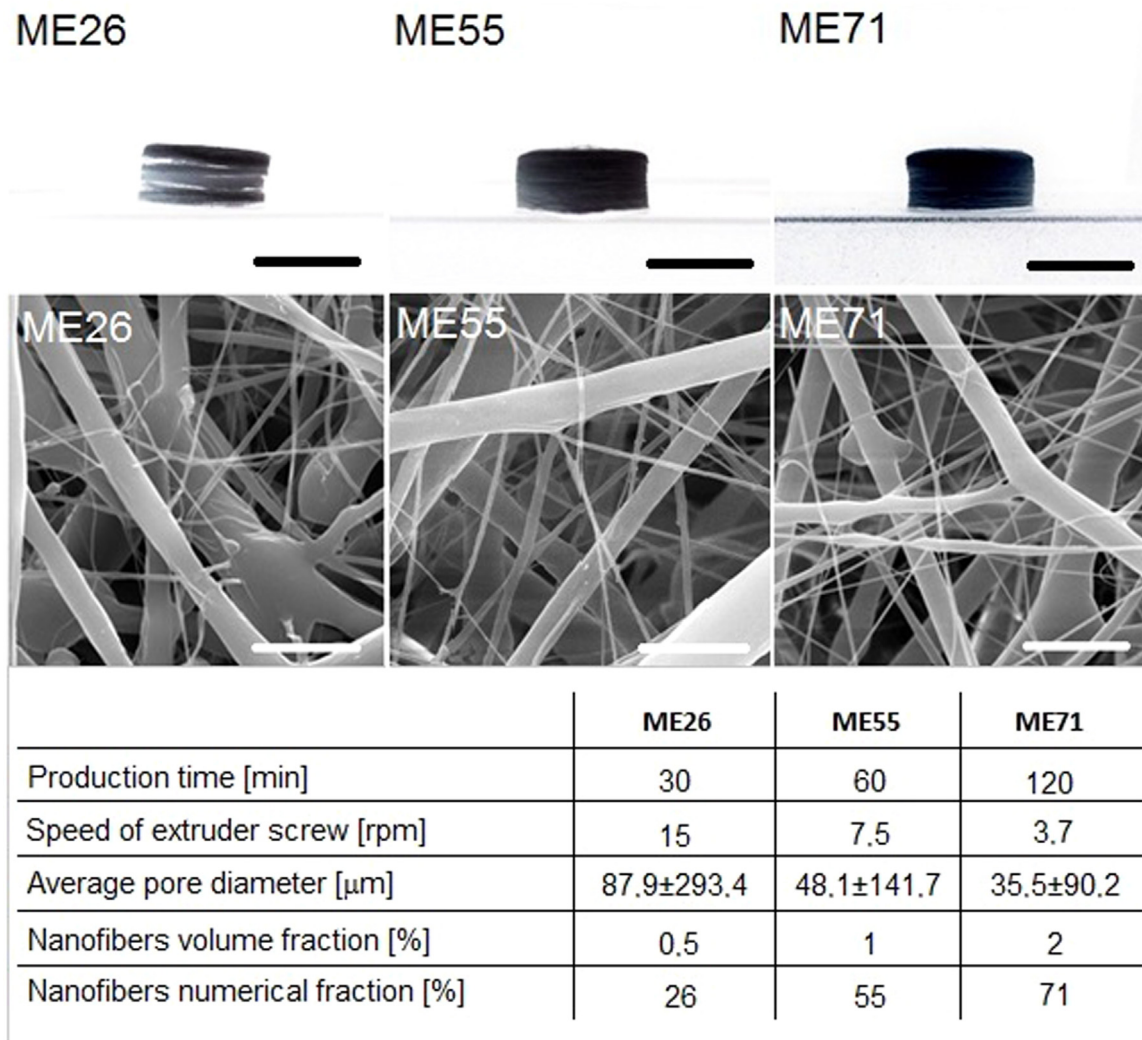


Fig. 2. The upper part – scaffold contour for all three tested materials observed by a projector, the scale bars are 10 mm long. The middle part-scaffold morphology observed by SEM scale bar is 20 μm . The lower part describes the production and structural variables for all three created samples.

MG63 cells were seeded (1×10^5 cells per sample) on scaffolds placed in 24-well tissue culture plates.

2.6. MTT assay for the cell proliferation

Cell proliferation was monitored after 1, 7, 14 and 21 days by MTT assay. A 250 μl of MTT solution (2 mg/ml in PBS pH 7.4) was added to 750 μl of a medium (EMEM) and incubated with a sample for 3 h at 37 $^\circ\text{C}$ /5% CO_2 . Formazane crystals were solubilized with isopropyl alcohol. Absorbance of the formazane solution was measured at 570 nm (ref. wavelength at 650 nm).

2.7. Microscopy analysis (SEM and fluorescence)

After day 1 and 21 after the cell seeding, the cell-cultured scaffolds were processed for microscopy analysis. The scaffolds were fixed by 2.5% glutaraldehyde and dehydrated with upgrading concentrations of ethanol (60–100%). The samples were analyzed by SEM (TescanVega 3SB) and image analysis software (NIS Elements, Nikon). For fluorescence microscopy (FM) the cells were fixed in ice – cold methanol for 15 min at 4 $^\circ\text{C}$, washed in PBS and stained with propidium iodide for 15 min in the dark. Then the samples were washed in PBS and analyzed by means of a fluorescence microscope (NICON Eclipse). Splitting of the samples into halves allowed us to observe the cell behavior inside the materials.

3. Results and discussion

Each sample had the same area density of 250 g^{-2} . When the density of PCL is 1.145 g cm^{-3} and the thickness of all three materials was 5 mm with the same 95% porosity. Morphology characteristics of the materials (fibers and pores diameters) were studied by SEM. The produced fibrous structures (Fig. 2) were analyzed by the image analysis software. Overall, the average electrospun fiber diameter was 701 ± 227 nm and the meltblown fibers diameter was 7.1 ± 4.9 μm in all samples. The volume fraction of nanofibers in all three materials was compared with micro fibers, these fractions were 0.5%, 1% and 2%. The numerical ratios of nanofibers and microfibers were 26%, 55% and 71%. The contour projection of samples ME55 and ME71 (Fig. 2) showed very good shape integrity of these two samples in comparison to the sample ME26, which was disintegrated to layers of irregular thickness. The sample ME26 with the numerical ratio of the nanofibers of 26% was thus unsuitable in terms of mechanical properties (Fig. 3).

3.1. In-vitro tests

The images from FM showed a similar degree of adhered cells on the first day of testing. From the 7th to 21st testing day the sample with the highest ratio of nanofibers (ME71) showed the highest rate of cell proliferation. Generally, microscopy shows that

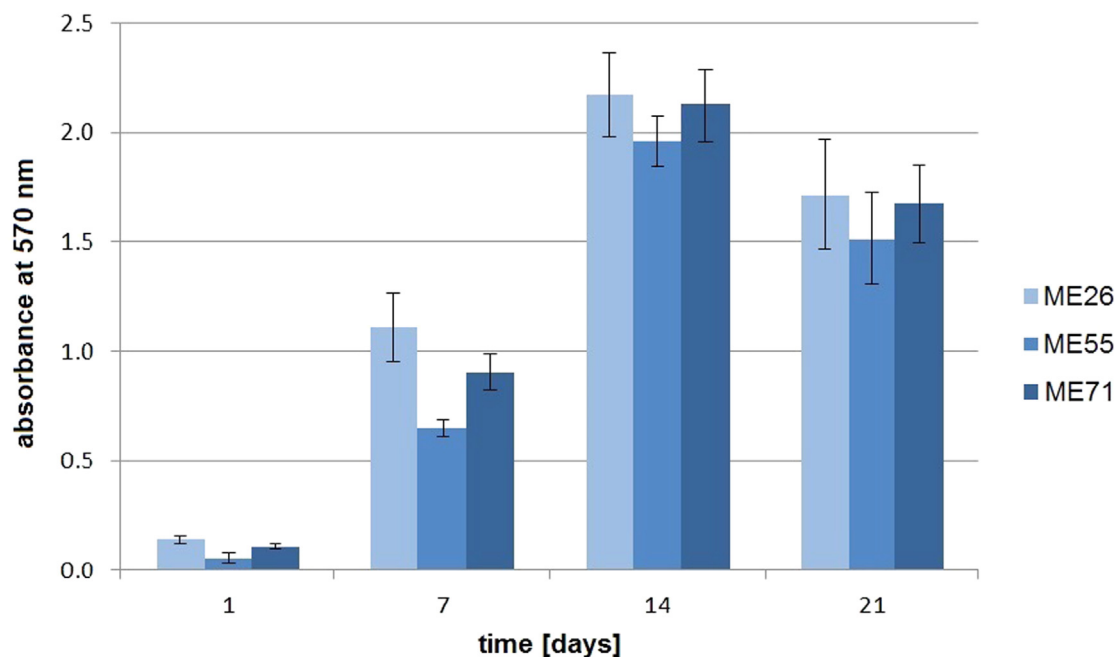
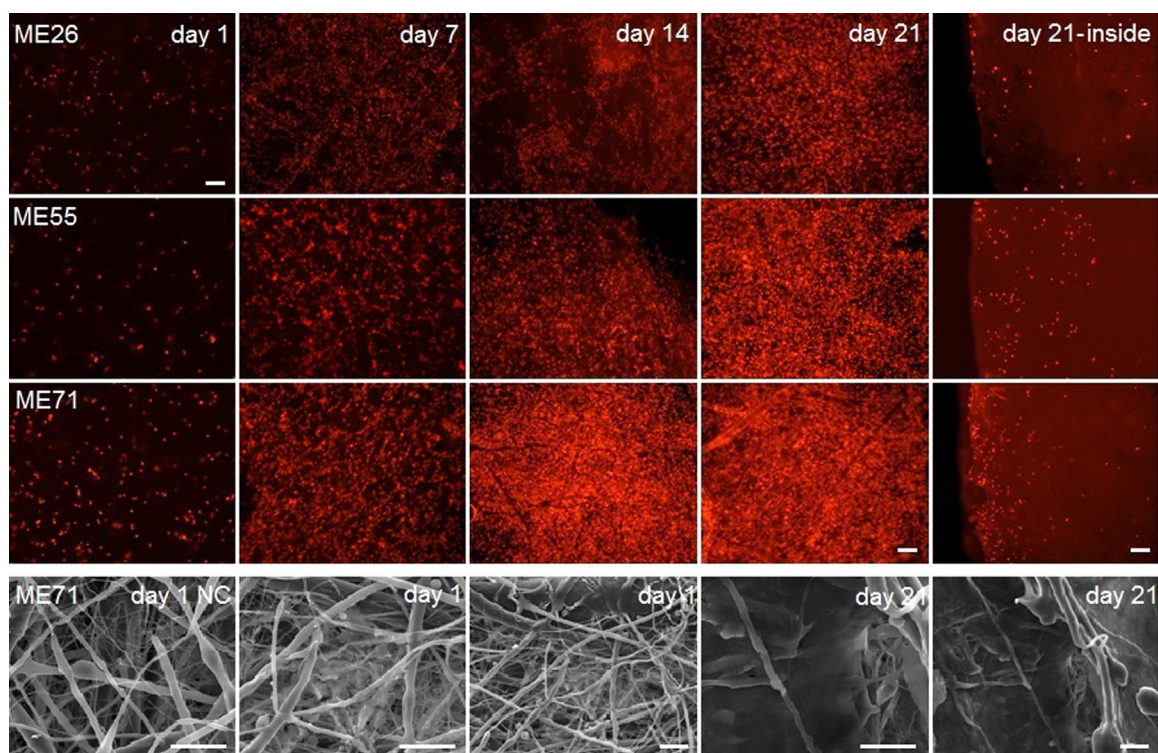


Fig. 3. FM images (upper part) of MG-63 cells on the materials (external view) on days 1, 7, 14 and 21. Images from a FM composed of 100 images was captured by a motorized microscope stage with a changing focus in the z axis of the 1 μm distance, the scale bar was 100 μm . FM images of MG-63 cells on the inner surface of the tested materials on day 21 (day 21 included) are presented here as basic views. Cell proliferation on the scaffolds was determined by MTT assay (lower part).

together with the increasing ratio of nanofibers in the composite the cell proliferation and confluence colonization of material increase as well. Proliferation into the inner structure was observed mainly from the edges into the center of the materials, and was similar in extent for all tested samples. The results from MTT assay showed contradictory results compared to the microscopy of the ME26 sample, where this material showed the highest cell viability. However, this was caused by shape disintegration. The samples made from this material were disintegrated to individual layers with different thickness. In comparison with other samples,

these layers provided a higher surface area for cell proliferation. Therefore, the results from MTT assay for material ME26 should be taken as relevant.

4. Conclusion

Various materials with controllable ratio of micro and nanofibers and their manufacturing technology have been developed. In this article we have demonstrated the beneficial effect of the

increasing ratio of nanofibers in the composite on the cell proliferation. The critical limit of the minimal ratio of nanofibers in the composite has been determined. The composite with lower nanofiber content disintegrates. On the basis of these results from *in-vitro* testing, we propose the ME71 composite as most suitable for bone tissue engineering. Further studies will include *in-vivo* tests and tests of manufacture reproducibility.

Acknowledgment

The research was supported by the project “Nanofiber materials for tissue engineering”, Reg. no. CZ.1.05/3.1.00/14.0308, which is co-financed by the European Social Fund and the State Budget of the Czech Republic.

References

- [1] D. Lukáš, A. Sarkar, L. Martinová, K. Vodsed'álková, D. Lubasová, J. Chaloupek, P. Pokorný, P. Mikeš, J. Chvojka, M. Komárek, Physical principles of electrospinning, *Text. Prog.* 41 (2) (2009) 59–140.
- [2] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospraying and their applications in nanofibers, *Compos. Sci. Technol.* 63 (2003) 2223–2253.
- [3] S. Guceri, Y.G. Gogotsi, V. Kuznetsov, *Nanoeng. Nanofibrous Mater.* (2003) 97–106.
- [4] T.L. Cato, Y. Khan, *Polymer/Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Scaffold Tissue Eng.* (2006) 253–282, ISBN: 1-4020-2549-1.
- [5] S.J. Russell, *Handbook of nonwovens*, ISBN: 978-1-185573-603-0, 2007, pp 172–185.
- [6] B. Gutarowska, A. Michalski, *Fiber. Text. East. Eur.* 17 (2009) 23–28.
- [7] J. Erben, K. Pilarova, F. Sanetrnik, J. Chvojka, V. Jencova, L. Blazkova, J. Havlicek, O. Novak, P. Mikes, E. Prosecka, D. Lukas, E. Kuzelova Kostakova, The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering, *Mater. Lett.* 143 (2015) 172–176 (WoS).
- [8] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nat. Mater.* 4 (2005) 518–524.
- [9] G. Wei, P.X. Ma, Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 25 (2004) 4749–4757.
- [10] S. Fransiska, M.H. Ho, C.H. Li, J.L. Shih, S.W. Hsiao, D.V.H. Thien, To enhance protein production from osteoblasts by using micro-patterned surfaces, *Biochem. Eng. J.* 78 (2013) 120–127.

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 018

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

D04H 1/728 (2012.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
D01D 5/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-947**
 (22) Přihlášeno: **22.12.2014**
 (40) Zveřejněno: **22.06.2016**
(Věstník č. 25/2016)
 (47) Uděleno: **11.05.2016**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.06.2016**
(Věstník č. 25/2016)

(56) Relevantní dokumenty:

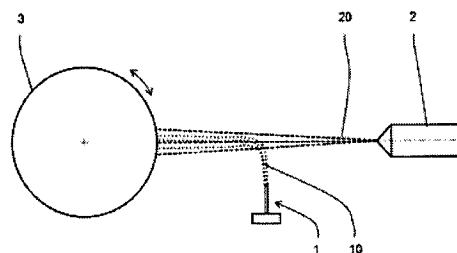
CN 103147226 A; CN 102443870B B; US 7309849 B2; CZ 304137 B6; CZ 2009-149 A.

(73) Majitel patentu:
Technická univerzita v Liberci, Liberec 1, CZ

(72) Původce:
 prof. RNDr. David Lukáš, CSc., Liberec 6, CZ
 Ing. Petr Mikeš, Ph.D., Mníšek u Liberce, CZ
 doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Turnov, CZ
 Ing. Pavel Pokorný, Ph.D., Frýdlant v Čechách, CZ
 Ing. Ondřej Novák, Ph.D., Liberec 5, CZ
 Bc. Filip Sanetník, Liberec 1, CZ
 Ing. Jiří Chvojka, Ph.D., Liberec 2, CZ
 Ing. Jiří Havlíček, CSc., Hradec Králové, CZ
 Ing. Věra Jenčová, Ph.D., Liberec 6, CZ
 Mgr. Jana Horáková, Jablonné v Podještědí, CZ
 Ing. Lenka Blažková, Jablonec nad Nisou, CZ
 Mgr. Kateřina Pilařová, Ústí nad Labem, CZ
 Ing. Jakub Erben, Vrchlabí, CZ
 Bc. Jan Kavačičin, Turnov, CZ

(74) Zástupce:
 Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
 Dobroslav Musil, Zábrdovická 11, 615 00 Brno

kombinuje výhodné vlastnosti polymerních nanovláken (10), zejména jejich velký měrný povrch, vysokou sorpční kapacitu, mikronové či submikronové mezivláknenné prostory s výhodnými mechanickými vlastnostmi mikrovláken (20). Vynález se dále týká také zařízení k provádění tohoto způsobu a kompozitního textilního materiálu vyrobeného tímto způsobem a obsahujícího polymerní nanovlákná (10) uložená na povrchu a mezi mikrovláknny (20) nebo mezi dvěma vrstvami mikrovláken (20).



(54) Název vynálezu:
Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná

(57) Anotace:
 Při způsobu výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10) s alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (1), na principu odstředivého zvlákňování nebo elektrického zvlákňování, vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláknny (10), který se ukládá na povrch kolektoru (3), na který se současně ukládají také mikrovlákná (20) vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování. Přitom na povrchu kolektoru (3) vzniká kompozitní textilní materiál, který

CZ 306018 B6

Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovláknna

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna.

- 10 Vynález se dále týká také zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna. Kromě toho se vynález dále týká také tohoto textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna.

15 Dosavadní stav techniky

- 20 Do současné doby bylo vyvinuto několik postupů pro výrobu nanovláken, tj. vláken o průměru pod 1 mikrometr, které jsou založeny na různých fyzikálních nebo chemických procesech. Nejvýznamnějším z nich, a v současné době také jediným, který je schopen vyrábět nanovláknna v průmyslovém měřítku, je elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrné napětí, při kterém se nanovláknna formují silovým působením elektrického pole vytvořeného mezi alespoň jednou sběrnou elektrodou a alespoň jednou zvlákňovací elektrodou z roztoku nebo taveniny polymeru. Přitom je výhodné, pokud je zvlákňovací elektroda tvořená tělesem protáhlého tvaru – např. dle CZ 294 274, nebo pokud obsahuje protáhlý zvlákňovací prvek/prvky – např. dle 25 CZ 299 549 po kruhové dráze se pohybující nebo dle CZ 300 345 statickou nebo ve směru své délky se pohybující strunu, atd., a roztok nebo tavenina polymeru se zvlákňuje z povrchu této zvlákňovací elektrody, resp. jejího zvlákňovacího prvku/prvků, neboť v takových případech se dosahuje nejvyšší rovnoměrnosti vytvářené vrstvy polymerních nanovláken.

- 30 V CZ 304 137 pak byla navržena modifikace tohoto procesu, u které se elektrické pole pro elektrostatické zvlákňování vytváří mezi zvlákňovací elektrodou, na kterou se přivádí střídavé napětí, a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými a/nebo přivedenými do jejího okolí. Podle aktuální fáze střídavého napětí se pak na zvlákňovací elektrodě vytváří polymerní nanovláknna s opačným elektrickým nábojem a/nebo s úseky s opačným elektrickým nábojem, která po svém vzniku 35 v důsledku působení elektrostatických sil vytváří objemový útvar, který se volně pohybuje ve směru gradientu elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody. Dle teoretických srovnání dosahuje tato varianta až několikanásobně vyššího výkonu než varianty založené na stejnosměrném napětí.

- 40 Kromě těchto postupů založených na využití silového působení elektrického pole je dále známý také způsob pro výrobu nanovláken založený na využití odstředivé síly, kdy je roztok nebo tavenina polymeru vytlačován/vytlačována odstředivou silou z otvorů vytvořených v plášti rotujícího tělesa ve tvaru disku (viz např. DE 102005048939) nebo válce (viz např. JP 2008/127 726).

- 45 Nevýhodou nanovláken vytvářených kterýmkoliv z výše popsanych postupů je to, že je nelze díky jejich velmi nízké pevnosti a soudržnosti využít samostatně, a vždy je nutné je, obvykle již během výroby, ukládat na vhodné podpůrné materiály (např. textilií, papír, kovovou nebo plastovou fólii nebo mřížku, apod.), které jim poskytují požadované mechanické vlastnosti, avšak 50 současně svou přítomností značně omezují jejich reálné využití. Bez uložení na podkladový materiál, případně po sejmutí z něj, se nanovláknna díky svému velkému měrnému povrchu (obvykle ještě v kombinaci se zbytkovým elektrickým nebo elektrostatickým nábojem) a z toho vyplývající vysoké adhezi samovolně shlukují a velmi ochotně ulpívají na okolních předmětech, takže manipulace s nimi a jejich případné využití, je díky tomu značně problematické. Pokud se pak tyto shluky použijí pro přípravu kompozitních materiálů, nezaručují vytvoření struktur

s obvykle požadovaným rovnoměrným rozložením nanovláken, a tedy ani s rovnoměrným rozložením vlastností, resp. parametrů.

5 Cílem vynálezu je navrhnout způsob pro výrobu textilního kompozitního materiálu, který by obsahoval polymerní nanovlákná a další složku/složky, která/které by tomuto materiálu poskytovaly požadované mechanické vlastnosti a morfologii, aniž by však svou přítomností omezovaly reálné využití tohoto materiálu, specifických vlastností nanovláken, nebo přístup k nanovláknům.

10 Kromě toho je cílem vynálezu navrhnout zařízení k provádění tohoto způsobu a textilní kompozitní materiál, který by obsahoval nanovlákná a přitom měl vhodné mechanické vlastnosti pro praktické využití.

Podstata vynálezu

15 Cíle vynálezu se dosáhne způsobem výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, při kterém se alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (na principu odstředivého zvlákňování nebo elektrického zvlákňování) vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláknými, který se ukládá na povrch kolektoru, na který se současně ukládají také mikrovlákná vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo
20 jinou technologií pro výrobu mikrovláken. Přitom na povrchu kolektoru vzniká kompozitní textilní materiál, který kombinuje výhodné vlastnosti polymerních nanovláken – zejména jejich velký měrný povrch, vysokou sorpční kapacitu, mikronové či submikronové mezivláknenné prostory, apod. s výhodnými mechanickými vlastnostmi mikrovláken, díky čemuž je možné s ním velmi
25 dobře manipulovat nebo ho dále zpracovávat.

Objemový útvar tvořený polymerními nanovláknými a mikrovlákná se přitom na povrchu kolektoru ukládají navzájem nezávisle, nebo se objemový útvar tvořený polymerními nanovláknými před uložením na povrchu kolektoru paralelizuje mezní vrstvou vytvořenou proudem vzduchu nebo plynu
30 nesoucího nebo usměrňujícího mikrovlákná s těmito mikrovláknými, přičemž v obou případech se polymerní nanovlákná a mikrovlákná na povrch kolektoru ukládají do samostatných, střídajících se, vrstev.

V jiné variantě tohoto způsobu se do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými před jeho uložením na povrchu kolektoru zanáší mikrovlákná vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování. V takovém případě se polymerní nanovlákná zachytávají a ukládají na povrchu mikrovláken a spojují se s nimi, čímž se vytváří směs
35 polymerních nanovláken a mikrovláken, která se poté ukládá na kolektor nebo se odvádí do místa jejího dalšího zpracování a/nebo využití.

40 Kromě toho se cíle vynálezu dosáhne také zařízením pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, které obsahuje alespoň jeden zvlákňovací prvek pro výrobu objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými, jehož podstata spočívá v tom, že do prostoru výroby polymerních nanovláken a/nebo formování objemového útvaru tvořeného
45 polymerními nanovláknými je vyústěna alespoň jedna tryska zařízení pro výrobu mikrovláken technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo jinou technologií pro výrobu mikrovláken.

V jedné variantě je pak proti trysce/tryskám zařízení pro výrobu mikrovláken technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo jiného způsobu výroby
50 mikrovláken na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků uspořádán pohyblivý nebo statický kolektor pro uložení vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, nebo odvod vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná.

55

Kolektor je pak s výhodou vytvořený jako elektricky vodivý, přičemž je uzemněný, takže umožňuje odvod elektrického náboje z polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken, nebo je propojený se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky zařízení pro výrobu mikrovláken, v důsledku čehož jsou k němu mikrovlákná a případně vytvořená směs polymerních nanovláken a mikrovláken přitahována.

V jiné variantě provedení obsahuje kolektor elektricky vodivé prvky vzájemně oddělené elektricky nevodivými prvky nebo vzduchovými mezerami, přičemž tyto elektricky vodivé prvky jsou uzemněné, nebo jsou alespoň některé z nich propojené se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky zařízení pro výrobu mikrovláken. Mikrovlákná a/nebo nanovlákná se přitom s výhodou formují kolmo na tyto elektricky vodivé prvky.

V některých případech je pro dosažení požadovaného pohybu polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken nutné, aby byl prostor ve směru pohybu mikrovláken za pro vzduch průchozím kolektorem, a/nebo vnitřní prostor dutého kolektoru s pro vzduch průchozím pláštěm, propojen se zdrojem podtlaku. Případně může být na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků, než na které je vyústěna tryska/trysky zařízení pro výrobu mikrovláken technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování, nebo proti zvlákňovacímu prvku/prvkům uspořádána podtlaková tryska nebo vedení propojené s podtlakovou tryskou pro odvod vytvářeného textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná do místa jejího dalšího zpracování a/nebo využití.

Cíle vynálezu se dále dosáhne také kompozitním textilním materiálem obsahujícím polymerní nanovlákná, u kterého jsou polymerní nanovlákná uložena na povrchu a mezi mikrovlákný.

Polymerní nanovlákná přitom mohou být uspořádána do vrstvy uložené na vrstvě mikrovláken nebo mezi dvěma vrstvami mikrovláken, nebo s nimi mohou tvořit homogenní nebo v podstatě homogenní směs.

V obou variantách pak může v případě potřeby být v materiálu polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken a/nebo v mezivláknenných prostorech polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken zakomponována alespoň jedna vhodná přídavná látka, která nanovláknům a/nebo mikrovláknům poskytuje výhodné vlastnosti a/nebo zvláštní efekt.

Objasnění výkresů

Na přiloženém výkrese je na obr. 1 znázorněno schéma jedné varianty zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle vynálezu a princip jeho funkce, na obr. 2 schéma druhé varianty zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle vynálezu a princip jeho funkce, na obr. 3 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného způsobem podle vynálezu při zvětšení 1000x, na obr. 4 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 10000x, na obr. 5 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 4990x, na obr. 6 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 100x, na obr. 7 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 5000x, na obr. 8 schéma třetí varianty zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle vynálezu a princip jeho funkce, a na obr. 9 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného variantou způsobu podle vynálezu dle obr. 8, při zvětšení 500x.

Příklady uskutečnění vynálezu

5 Zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle vynálezu obsahuje alespoň jeden zvlákňovací prvek 1, kterým je ve variantách znázorněných na obr. 1, obr. 2 a obr. 8 zvlákňovací elektroda pro výrobu polymerních nanovláken zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli způsobem dle CZ 304 137, kdy se elektrické pole, resp. elektrická pole, vytváří mezi alespoň jednou zvlákňovací elektrodou, na kterou se z neznázorněného zdroje přivádí střídavé napětí, a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými ioni-

10 zací vzduchu a/nebo plynu v blízkosti zvlákňovací elektrody a/nebo přivedenými, resp. průběžně přiváděnými či přitahenými resp. průběžně přitahovanými do jejího okolí. Ve variantách znázorněných na obr. 1, obr. 2 a obr. 8 je tato zvlákňovací elektroda tvořená statickou trubičkou, avšak v dalších, neznázorněných variantách může být tvořená v podstatě libovolným jiným statickým tělesem (např. jehlou, tryskou, lištou, strunou, atd.) nebo libovolným pohybujícím se tělesem

15 (např. rotujícím podlouhlým tělesem, válcem, diskem, spirálou, prstencem, atd., nebo ve směru své délky nebo po kruhové dráze se pohybující strunou nebo skupinou strun, atd.).

V jiné, neznázorněné variantě provedení zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu podle vynálezu pak může být zvlákňovací prvek 1 tvořen zvlákňovací hlavou pro výrobu polymerních nanovláken odstředivým zvlákňováním. Tato hlava přitom obsahuje dutý plášť ve tvaru válce nebo disku, případně jiného tělesa, který je perforovaný množstvím otvorů, ze kterých je roztok nebo tavenina polymeru vytvářející polymerní nanovlákná vytlačován/vytlačována odstředivou silou vznikající při jeho rotaci. V jiné variantě odstředivého zvlákňování se může zvlákňovat i z povrchu rotující plochy. Působení odstředivé síly může být v případě potřeby doplněno působením pomocného proudu vzduchu/plynu a/nebo pomocného elektrického pole vytvořeného mezi zvlákňovací hlavou a kolektorem pro ukládání vytvářených nanovláken.

20

25

Do prostoru, ve kterém se vytváří polymerní nanovlákná 10 a/nebo do prostoru, ve kterém se formují do objemového útvaru (jak bude detailněji popsáno níže) je pak vyústěna alespoň jedna tryska 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo jinou známou technologií. Proti ústí této trysky/trysek 2 je na opačné straně zvlákňovacího prvku 1 uspořádán kolektor 3 tvořený ve variantě znázorněné na obr. 1 otáčejícím se válcem, a ve variantě znázorněné na obr. 2 pohybujícím se nekonečným pásem, který je určen pro ukládání vytvářeného textilního kompozitního materiálu. Povrch tohoto kolektoru 3, resp. jeho prvků je s výhodou vytvořen z materiálu, ke kterému má tento kompozitní materiál co nejmenší přilnavost, tj. např. z polytetrafluoretylenu (PTFE, teflon), apod., aby bylo možné ho z něj snadno a bez poškození sejmout. V jiných variantách provedení pak může mít kolektor 3 libovolný jiný tvar či konstrukci, přičemž může na svém povrchu obsahovat elektricky vodivé prvky uspořádané např. rovnoběžně s jeho podélnou osou, oddělené vzájemně elektricky nevodivými prvky nebo vzduchovými mezerami (např. ve smyslu článku Dan LI, Yuliang Wang and Younan Xia: Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays, Nano Letters 2003, Vol. 3, No. 8, p. 1167–1171) nebo může být tvořen např. kontinuálně, krokově, případně vratně se pohybujícím nekonečným pásem vhodného elektricky vodivého nebo elektricky nevodivého materiálu, případně skupinou nebo nekonečným pásem obsahujícím elektricky vodivé prvky vzájemně oddělené vzduchovou mezerou nebo prvky z elektricky nevodivého materiálu (např. ve smyslu US 2 123 992 nebo WO 2008/062 264, apod.), pohyblivou nebo statickou mřížkou, případně v podstatě libovolným jiným pohyblivým nebo statickým prvkem/prvky průchozím nebo neprůchozím pro vzduch. Pokud je kolektor 3 vytvořen z elektricky vodivého materiálu, nebo pokud obsahuje prvky pro ukládání textilního kompozitního materiálu z elektricky vodivého materiálu, je výhodné pokud je, resp. jeho prvky jsou, uzemněn/uzemněny, takže umožňují odvod případného zbytkového elektrického náboje uloženého v polymerních nanovláknách 10 a/nebo mikrovláknách 20, nebo pokud je na něj přivedeno napětí opačné polarity, než je napětí přiváděné na trysku/trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20.

30

35

40

45

50

Ve variantě provedení znázorněné na obr. 1 je kolektor 3 uložen svou podélnou osou na vodorovné rovině procházející ústím trysky 2, případně vedle sebe uspořádaných trysek 2 pro výrobu mikrovláken 20, avšak dle potřeby může být svou osou uložen pod nebo naopak nad touto rovinou. Prostor za kolektorem 3 a/nebo vnitřní prostor dutého kolektoru 3 s pláštěm průchozím pro vzduch (např. perforovaným nebo tvořeným mřížkou nebo obsahujícím vzduchové mezery oddělující jeho elektricky vodivé prvky, apod.) je pak s výhodou propojen s neznázorněným zdrojem podtlaku, který svým působením přitahuje vytvářená polymerní nanovlákná 10 a mikrovlákná 20 k povrchu kolektoru 3 a přitlačuje je k němu.

V případě potřeby může být kolektor 3 nahrazen jiným prostředkem pro odvod vytvářeného textilního kompozitního materiálu do místa jeho dalšího použití nebo zpracování, jako např. neznázorněnou podtlakovou tryskou, resp. vedením propojeným s podtlakovou tryskou, apod. Taková podtlaková tryska nebo s ní propojené vedení jsou s výhodou uloženy na opačné straně zvlákňovacího prvku 1, než na které je vyústěná tryska/trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20, avšak v neznázorněných variantách provedení může být tato tryska nebo toto vedení uložena/uloženo na opačné straně zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 než zvlákňovací prvek/prvky 1.

V dalších, neznázorněných variantách provedení může být do prostoru mezi zvlákňovací prvek/prvky 1 a ústí trysky/trysek 2 pro výrobu mikrovláken dále vyústěna alespoň jedna doplňková vzduchová/plynová tryska pro vhodné usměrnění a/nebo urychlení pohybu polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20 a/nebo směsi polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, která případně také napomáhá tuhnutí polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20 jejich ochlazením a/nebo odvodem par rozpouštědla.

Při provozu zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu osazeného alespoň jedním zvlákňovacím prvkem 1 tvořeným zvlákňovací elektrodou pro výrobu polymerních nanovláken 10 zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli způsobem dle CZ 304 137 se na tuto zvlákňovací elektrodu přivádí střídavé napětí a elektrické pole, resp. elektrická pole pro zvlákňování se vytváří mezi touto zvlákňovací elektrodou a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými ionizací vzduchu a/nebo plynu v blízkosti zvlákňovací elektrody a/nebo přivedenými, resp. průběžně přiváděnými či přitahovanými, resp. průběžně přitahovanými do jejího okolí. Silovým působením těchto elektrických polí se pak na povrchu roztoku nebo taveniny polymeru na povrchu zvlákňovací elektrody vytváří tzv. Taylorovy kužely, ze kterých se následně vydlužují jednotlivá polymerní nanovlákná 10. Střídavé napětí na zvlákňovací elektrodě, resp. periodická změna polarizace zvlákňovací elektrody přitom nedovolí systému vzduch (plyn) – zvlákňovaný roztok nebo tavenina polymeru dosáhnout trvale rovnovážného stavu distribuce iontů vzduchu/plynu, takže zvlákňování může probíhat se stálým výkonem v podstatně libovolně dlouho. Přitom se dle teoretických odhadů i experimentů ukazuje, že výkon tohoto typ elektrostatického zvlákňování je několikanásobně (cca až 5krát či dokonce až 10krát) větší než u elektrostatického zvlákňování při použití stejnoměrného napětí. Vytvářená polymerní nanovlákná 10 se přitom výhodně formují do objemového útvaru, který se pohybuje ve směru gradientu vytvářených elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody.

Na zvlákňovací elektrodu se s výhodou přivádí střídavé napětí o velikosti 10 až 70 kV, s frekvencí 35 až 400 Hz.

Při provozu zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu osazeného zvlákňovacím prvkem 1 tvořeným zvlákňovací hlavou pro výrobu nanovláken odstředivým zvlákňováním vytváří polymerní nanovlákná 10 objemový útvar, který se pohybuje směrem od této hlavy v důsledku své setrvačnosti případně doplněné alespoň jedním pomocným proudem vzduchu/plynu a/nebo působením pomocného elektrického pole.

Do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými 10 a pohybujícího se směrem od zvlákňovacího prvku 1 se z trysky/trysek 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 přivádí mikrovlákná 20, na kterých se polymerní nanovlákná 10 zachytávají, ukládají a případně je (alespoň částečně) obalují, a vytváří tak s nimi kompozitní, samonosný materiál textilního charakteru, s v
 5 podstatě homogenním uspořádáním polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20 (viz např. obr. 3, 5, 6, 7). Polymerní nanovlákná 10 a/nebo mikrovlákná 20 přitom mohou v případě potřeby být, díky vhodnému vzájemnému uspořádání jednotlivých prvků zařízení podle vynálezu, v okamžiku kontaktu alespoň částečně v plastickém, resp. ne zcela ztuhlém stavu, díky čemuž se oba typy vláken velmi snadno a současně velmi pevně spojují. Takto vytvořený textilní kompozitní
 10 materiál se přitom díky kinetické energii mikrovláken 20 a případně i působení proudu vzduchu nebo jiného plynu, který je vytváří a/nebo unáší, a případně i elektrické přitažlivosti (např. pokud je kolektor 3 nebo jeho elektricky vodivé prvky elektricky nabitý a mikrovlákná se vytváří elektrostatickým zvlákňováním), pohybuje směrem ke kolektoru 3, na který se ukládá. Takto vytvořený textilní kompozitní materiál pak v sobě kombinuje výhodné vlastnosti polymerních nanovláken 10 – tj. např. velký měrný povrch, vysokou sorpční kapacitu, mikronové či submikronové
 15 mezivláknenné prostory, apod. s výhodnými mechanickými vlastnostmi mikrovláken 20, díky čemuž je možné s ním velmi dobře manipulovat. Vzhledem k tomu, že kolektor 3 nemusí být ve většině případů elektricky nabitý, resp. ani elektricky aktivní, a textilní kompozitní materiál se tak k němu pohybuje díky své setrvačnosti a/nebo v důsledku působení alespoň jednoho proudu vzduchu/plynu, nedochází při uložení větší vrstvy textilního kompozitního materiálu na něm
 20 k jeho „odstínění“, takže vytvářený textilní kompozitní materiál se na kolektor 3 ukládá po celou dobu stejně ochotně, resp. se stejnou intenzitou. Díky tomu lze připravit vrstvu tohoto textilního kompozitního materiálu s v podstatě libovolnou požadovanou tloušťkou a/nebo tento materiál kombinovat s alespoň jednou vrstvou libovolného vhodného materiálu a vytvářet tak vícevrstvý
 25 materiál.

Jako kolektor 3 je možné použít také přímo materiál nebo výrobek, na kterém má být vytvořený textilní kompozitní materiál uložený během svého použití.

30 Jak se během experimentů ukazuje, vytváří se při použití technologie meltblown pro výrobu mikrovláken 20 určitý malý podíl nanovláken (cca kolem 1 %), které jsou z hlediska výroby mikrovláken 20 zanedbatelné, avšak z hlediska výsledného textilního kompozitního materiálu a jeho výsledných vlastností hrají nezanedbatelnou roli.

35 Vhodným uspořádáním jednotlivých prvků zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu, jejich počtu a nastavením jednotlivých technologií je pak možné s využitím tohoto zařízení vytvářet textilní kompozitní materiál s v podstatě libovolným podílem polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, dle požadavků a předpokládané aplikace. Polymerní nanovlákná 10 a/nebo mikrovlákná 20 přitom mohou být
 40 vytvořena ze stejného nebo odlišného materiálu, případně mohou být polymerní nanovlákná 10 (např. při využití většího počtu zvlákňovacích prvků 1) a/nebo mikrovlákná 20 (při využití většího počtu trysek 2) vytvářena postupně nebo průběžně z různých materiálů. Kromě toho mohou v případě potřeby polymerní nanovlákná 10 a/nebo mikrovlákná 20 ve své struktuře obsahovat (nano)částice vhodné přídavné látky, které, nebo jejichž prekursor, se před zvlákňováním přidávají
 45 do roztoku nebo taveniny polymeru (viz např. CZ 300 797), a při zvlákňování se zakomponují do struktury vytvářených nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20. Kromě toho nebo v kombinaci s tím se mohou do polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20 a/nebo do jejich směsi přidávat alespoň jedním neznázorněným dávkovacím zařízením částice alespoň jedné kapalné a/nebo pevné přídavné, resp. aktivní látky, dle předpokládaného použití textilního kompozitního
 50 materiálu, které se pak ukládají ve struktuře vytvářeného textilního kompozitního materiálu.

V dalších neznázorněných variantách provedení mohou být jednotlivé prvky zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu uspořádány jinak, než je znázorněno ve variantách na obr. 1, obr. 2 a obr. 8, přičemž vytváření polymer-
 55 ních nanovláken 10 může probíhat v podstatě libovolně (šikmo) nahoru, (šikmo) do boku, nebo

(šikmo) dolů, a vytváření mikrovláken 20 pak podle toho (šikmo) do boku, nebo (šikmo) nahoru nebo (šikmo) dolů, s výhodou tak, aby mikrovlákná 20 pronikala do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými 10 pod pravým nebo libovolným ostrým úhlem. V každém případě se však kompozitní materiál tvořený směsí polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20 vytvoří ještě před dopadem na kolektor 3, a po dopadu na něj se již jeho struktura a rozložení jednotlivých složek, resp. typů vláken nemění.

Výhodou přípravy polymerních nanovláken 10 prostřednictvím střídavého napětí nebo odstředivé síly je to, že vytvořený objemový útvar polymerních nanovláken 10 je elektricky neutrální (buď nenese žádný elektrický náboj, nebo se elektrické náboje v jeho různých částech navzájem vyruší), a zejména to, že tyto procesy umožňují vytvářet polymerní nanovlákná 10 v několikanásobně větším množství než elektrostatické zvlákňování s využitím stejnoměrného napětí, což umožňuje také stejným poměrem zvýšit kapacitu použití technologie/technologií pro výrobu mikrovláken 10, a dosáhnout několikanásobně vyšší produktivity.

Níže jsou pro názornost uvedeny konkrétní příklady provedení zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu a podmínky jeho provozu, s popisem a fotografiemi připravených textilních kompozitních materiálů.

20

Příklad 1

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo zařízení podle vynálezu, které obsahovalo jeden zvlákňovací prostředek 1 tvořený zvlákňovací elektrodou ve tvaru trubičky uspořádanou pro zvlákňování směrem nahoru (obr. 1), na kterou se přivádělo střídavé napětí o velikosti 50 kV a frekvenci 50 Hz. Ve vertikální vzdálenosti 20 cm nad ústím této zvlákňovací elektrody a v horizontální vzdálenosti 51 cm od něj byla vyústěna jedna tryska 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown, proti které byl na opačné straně zvlákňovacího prostředku 1 v horizontální vzdálenosti 17 cm od ústí zvlákňování elektrody uložen otočný válcový kolektor 3 vytvořený z elektricky nevodivého materiálu. Tlak vzduchu dodávaného do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 byl 10 Psi.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 3.

35

Příklad 2

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že tlak vzduchu dodávaného do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 byl 20 Psi.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 4, ze kterého je zřejmé, že zvýšení tlaku vzduchu při výrobě mikrovláken vedlo k vytvoření svazků polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20.

45

Příklad 3

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že vzduch dodávaný do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 měl teplotu 204,44 °C.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 5, ze kterého je zřejmé, že zvýšení teploty vzduchu při výrobě mikrovláken 20 vedlo ke spojování mikrovláken 20 a polymerních nanovláken 10 prostřednictvím pevných kontaktů.

55

Příklad 4

5 Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákn 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že vertikální vzdálenost trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown nad ústím 20 zvlákňovací elektrody byla 10 cm.

10 SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 6, ze kterého je zřejmé, že zmenšení vertikální vzdálenosti trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 nad ústím zvlákňovací elektrody vedlo k vytvoření orientované struktury obsahující polymerní nanovlákn 10 a mikrovlákn 20.

15

Příklad 5

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákn 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 4, s tím rozdílem, že
20 vzduch dodávaný do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 měl teplotu 93,3 °C.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 7, ze kterého je zřejmé, že zvýšená teplota vzduchu při výrobě mikrovláken 20 nebyla dostatečná k vytvoření pevných kontaktů mezi polymerními nanovlákn 10 a mikrovlákn 20.

25

Ve variantě zařízení pro výrobu kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákn 10 podle vynálezu znázorněné na obr. 8, jsou tryska/trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 a zvlákňovací prvek/prvky 1 pro výrobu polymerních nanovláken 10 uspořádány tak, že vytvářená polymerní nanovlákn 10 nevstupují do proudu mikrovláken 20, ale jsou strhávána mezní
30 vrstvou vytvořenou proudem vzduchu/plynu nesoucího mikrovlákn 20. V takovém případě překvapivě nedochází k míšení polymerních nanovláken 10 s mikrovlákn 20 a vytváření směsi, ale k paralelizaci polymerních nanovláken 10 s mikrovlákn 20, přičemž se oba typy vláken na kolektoru 3 ukládají do samostatných vrstev – viz příklad 6 a obr. 9.

35

Příklad 6

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákn 10 se použilo
40 zařízení podle vynálezu, které obsahovalo jeden zvlákňovací prostředek 1 tvořený zvlákňovací elektrodou ve tvaru trubičky uspořádanou pro zvlákňování směrem nahoru (obr. 8), na kterou se přivádělo střídavé napětí o velikosti 50 kV a frekvenci 50 Hz. Ve vertikální vzdálenosti 20 cm nad ústím této zvlákňovací elektrody a v horizontální vzdálenosti 55 cm od něj byla vyústěna jedna tryska 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown, proti které byl na opačné straně zvlákňovacího prostředku 1 v horizontální vzdálenosti 17 cm od ústí zvlákňování
45 elektrody uložen otočný válcový kolektor 3 vytvořený z elektricky nevodivého materiálu. Tlak vzduchu dodávaného do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 byl 8 Psi.

Polymerní nanovlákn 10 byla v tomto případě strhávána mezní vrstvou vytvořenou proudem vzduchu nesoucího mikrovlákn 20. Na obr. 9 je SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu, ze kterého je zřejmé že polymerní nanovlákn 10 i mikrovlákn 20 se na
50 povrchu podkladu ukládala do samostatných, střídajících se, vrstev.

V jiné, neznázorněné variantě provedení zařízení pro výrobu kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákn podle vynálezu, jsou tryska/trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken
55 20 a zvlákňovací prvek/prvky 1 pro výrobu polymerních nanovláken uspořádány zcela odděleně,

přičemž každý typ vláken se na kolektor 3 nanáší samostatně a případně i v jiném místě kolektoru 3, což vede k vytváření vrstev samostatných polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, podobně jako v předchozí variantě. Přitom je výhodné, pokud je např. kolektor 3 uložen nad zvlákňovacím prvkem/prvky 1 pro výrobu polymerních nanovláken 10, takže polymerní nanovláčka 10 se na něj ukládají bez nutnosti jejich usměrňování a/nebo nesení např. proudem vzduchu/plynu, a mikrovláčka 20 se k němu pohybují působením proudu vzduchu/plynu použitého pro jejich výrobu a/nebo elektrického pole vytvořeného mezi tryskou/tryskami 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 a kolektorem 3. V jiném prostorovém uspořádání a/nebo v případě potřeby je však možné i polymerní nanovláčka unášet a/nebo usměrňovat ke kolektoru 3 proudem vzduchu/plynu, a/nebo, v případě, kdy během jejich výroby dojde k jejich nabití elektrickým nábojem, elektrickým polem, resp. přivedením elektrického náboje opačné polarity na kolektor 3.

Textilní kompozitní materiál podle vynálezu v kterékoliv variantě má celou řadu využití, přičemž jako nejvhodnější se v současné době jeví jeho využití jako scaffoldu, resp. nosiče pro osazení živými buňkami pro tkáňové inženýrství, popř. krytu ran. Tomuto využití pak musí odpovídat použité materiály polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, a případně i přídavné, resp. aktivní látka/látky zakomponované v materiálu polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20, a/nebo v mezivláčkenných prostorech textilního kompozitního materiálu.

Dalším významným využitím textilního kompozitního materiálu podle vynálezu je i oblast filtrace, přičemž tento materiál umožňuje zkonstruovat vláknenný filtr o vyšší porózitě a tudíž nižších nárocích na tlakové spády. Mikrovláčka 20 přitom vytvářejí tužší kostru filtru a polymerní nanovláčka 10 významně zvyšují jeho efektivitu při hloubkové filtraci.

PATENTOVÉ NÁROKY

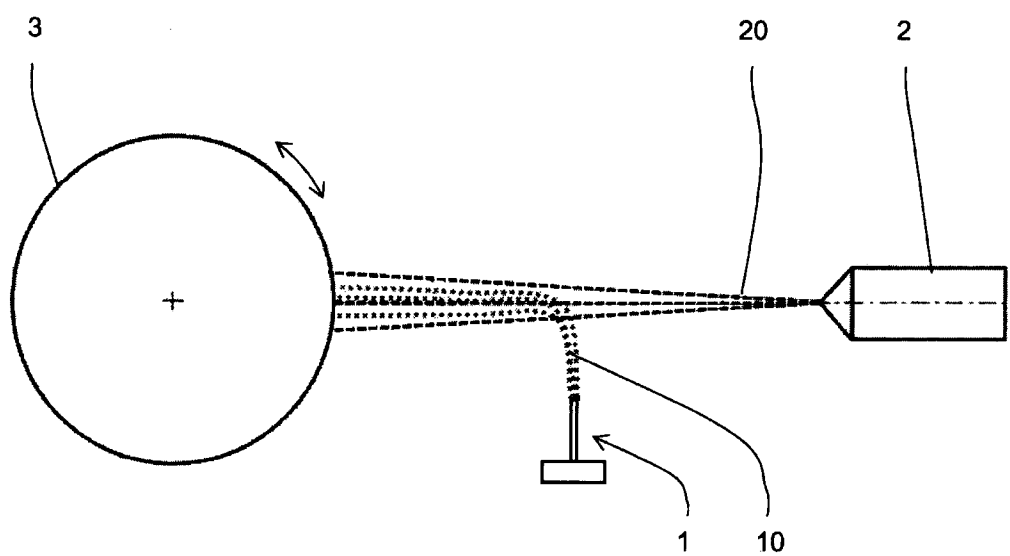
1. Způsob výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovláčka (10), při kterém se alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (1) vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10), **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že tento objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10) se ukládá na povrch kolektoru (3), na který se současně ukládají také mikrovláčka (20) vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10) a mikrovláčkami (20) se na povrchu kolektoru (3) ukládají navzájem nezávisle do samostatných, střídajících se, vrstev.

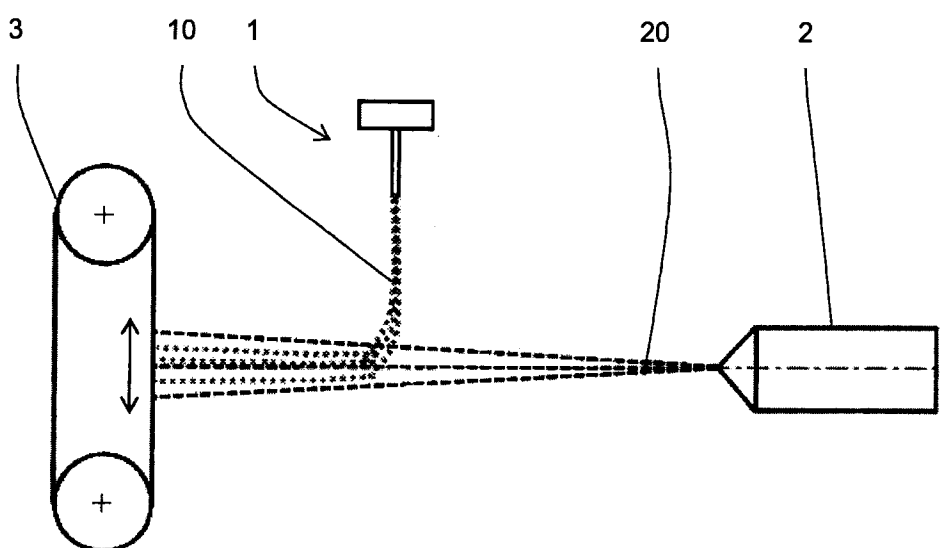
3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10) se před uložením na povrchu kolektoru (3) paralelizuje mezní vrstvou vytvořenou proudem vzduchu nebo plynu nesoucího nebo usměrňujícího mikrovláčka (20) s těmito mikrovláčkami (20), přičemž polymerní nanovláčka (10) a mikrovláčka (20) se na povrch kolektoru (3) ukládají navzájem nezávisle do samostatných, střídajících se, vrstev.

4. Způsob výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovláčka (10), při kterém se alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (1) vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10), **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláčkami (10) se před jeho uložením na povrchu kolektoru (3) zanáší mikrovláčka (20) vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování, přičemž polymerní nanovláčka (10) se zachytávají a ukládají na povrchu mikrovláken (20) a spojují se s nimi, čímž se vytváří směs polymerních nanovláken (10) a mikrovláken (20), která se poté ukládá na kolektor (3) nebo se odvádí do místa jejího dalšího zpracování a/nebo využití.

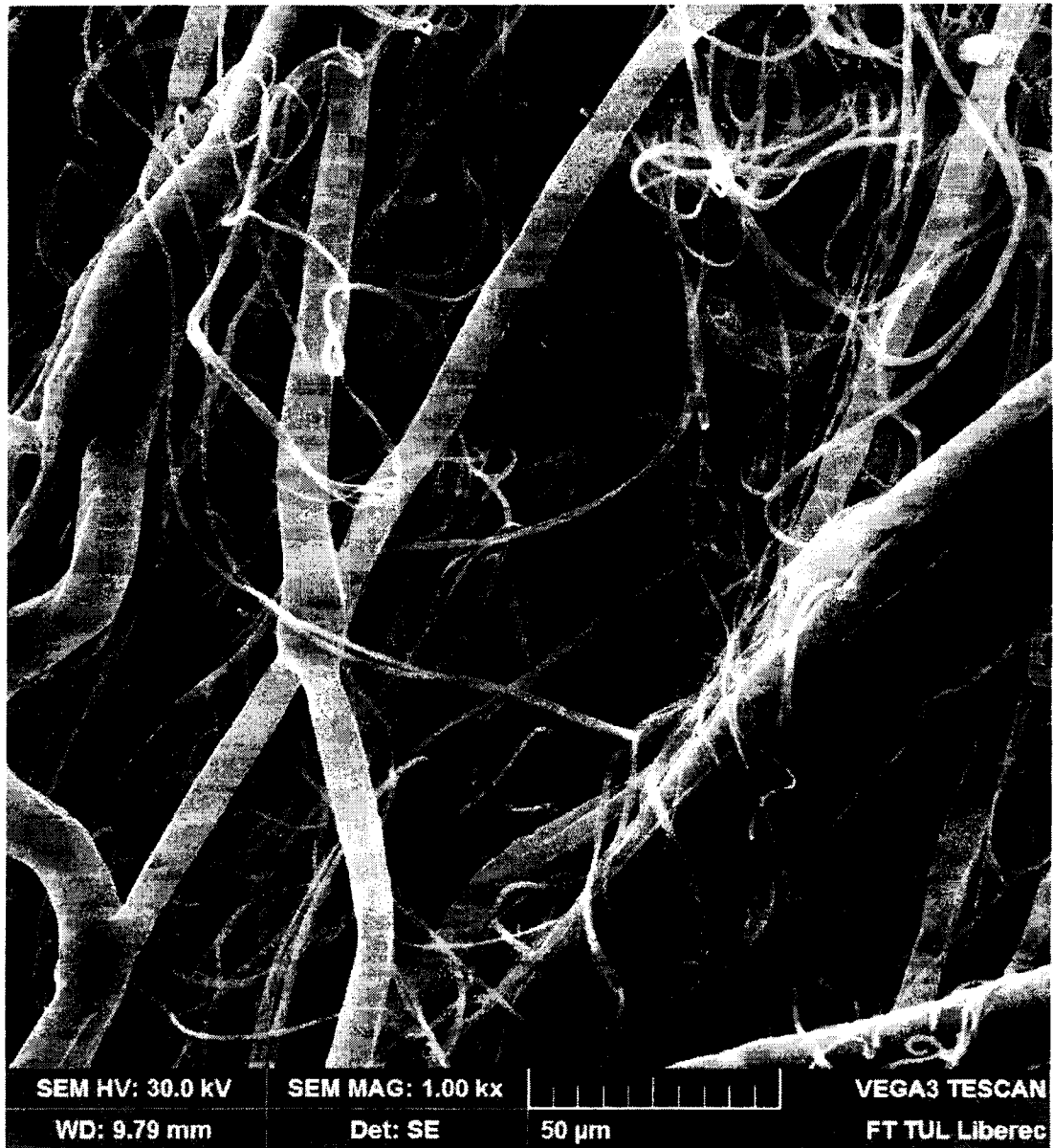
5. Zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu podle libovolného z nároků 1 až 4, obsahujícího polymerní nanovlákná (10), které obsahuje alespoň jeden zvlákňovací prvek (1) pro výrobu objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými (10), **vyznačující se tím**, že do prostoru výroby polymerních nanovláken (10) a/nebo formování objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými (10) je vyústěna alespoň jedna tryska (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20) technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování.
6. Zařízení podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že proti trysce/tryskám (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20) technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování je na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků (1) uspořádán pohyblivý nebo statický kolektor (3) pro uložení vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10), nebo odvod vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10).
7. Zařízení podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že kolektor (3) je elektricky vodivý, a je uzemněný, nebo je propojený se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20).
8. Zařízení podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že kolektor (3) obsahuje elektricky vodivé prvky vzájemně oddělené elektricky nevodivými prvky nebo vzduchovými mezerami, přičemž tyto elektricky vodivé prvky jsou uzemněné, nebo jsou alespoň některé z nich propojené se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20).
9. Zařízení podle libovolného z nároků 5 až 8, **vyznačující se tím**, že prostor ve směru pohybu mikrovláken (20) za pro vzduch průchozím kolektorem (3) a/nebo vnitřní prostor dutého kolektoru (3) s pro vzduch průchozím pláštěm je propojen se zdrojem podtlaku.
10. Zařízení podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků (1), než na které je vyústěna tryska/trysky (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20) technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování, nebo proti zvlákňovacímu prvku/prvkům (1) je uspořádána podtlaková tryska nebo vedení propojené s podtlakovou tryskou pro odvod vytvářeného textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10).
11. Kompozitní textilní materiál vytvořený způsobem podle libovolného z nároků 1 až 4 na zařízení podle libovolného z nároků 5 až 10, obsahující polymerní nanovlákná (10), **vyznačující se tím**, že polymerní nanovlákná (10) jsou uložena na povrchu a mezi mikrovláknými (20).
12. Kompozitní textilní materiál vytvořený způsobem podle libovolného z nároků 1 až 4 na zařízení podle libovolného z nároků 5 až 10, obsahující polymerní nanovlákná (10), **vyznačující se tím**, že polymerní nanovlákná (10) jsou uspořádána do vrstvy uložené na vrstvě mikrovláken (20) nebo mezi dvěma vrstvami mikrovláken (20).
13. Kompozitní textilní materiál podle nároku 11 nebo 12, **vyznačující se tím**, že v materiálu polymerních nanovláken (10) a/nebo mikrovláken (20) a/nebo v mezivláknenných prostorech polymerních nanovláken (10) a/nebo mikrovláken (20) je zakomponována alespoň jedna přídatná látka.



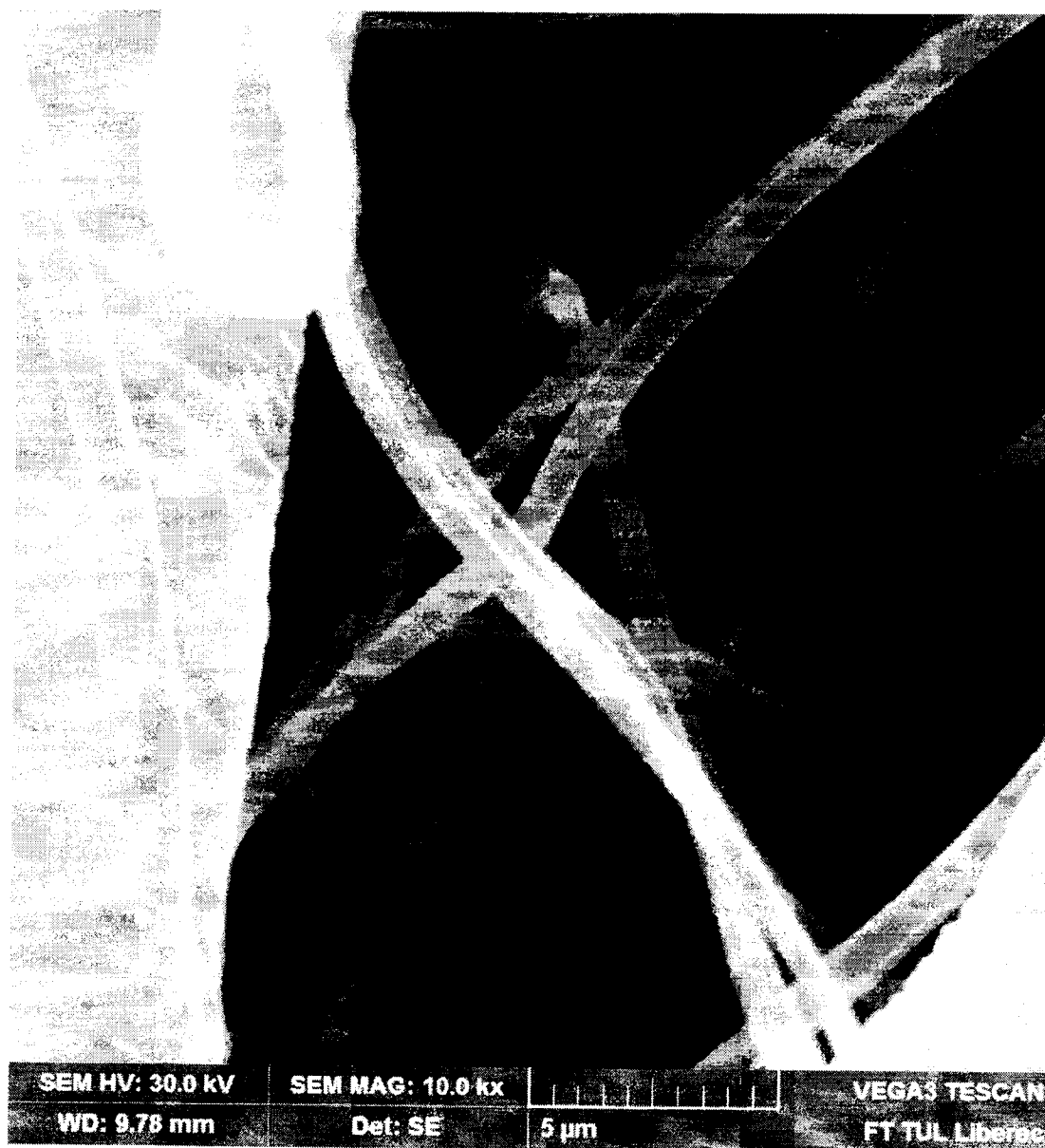
Obr. 1



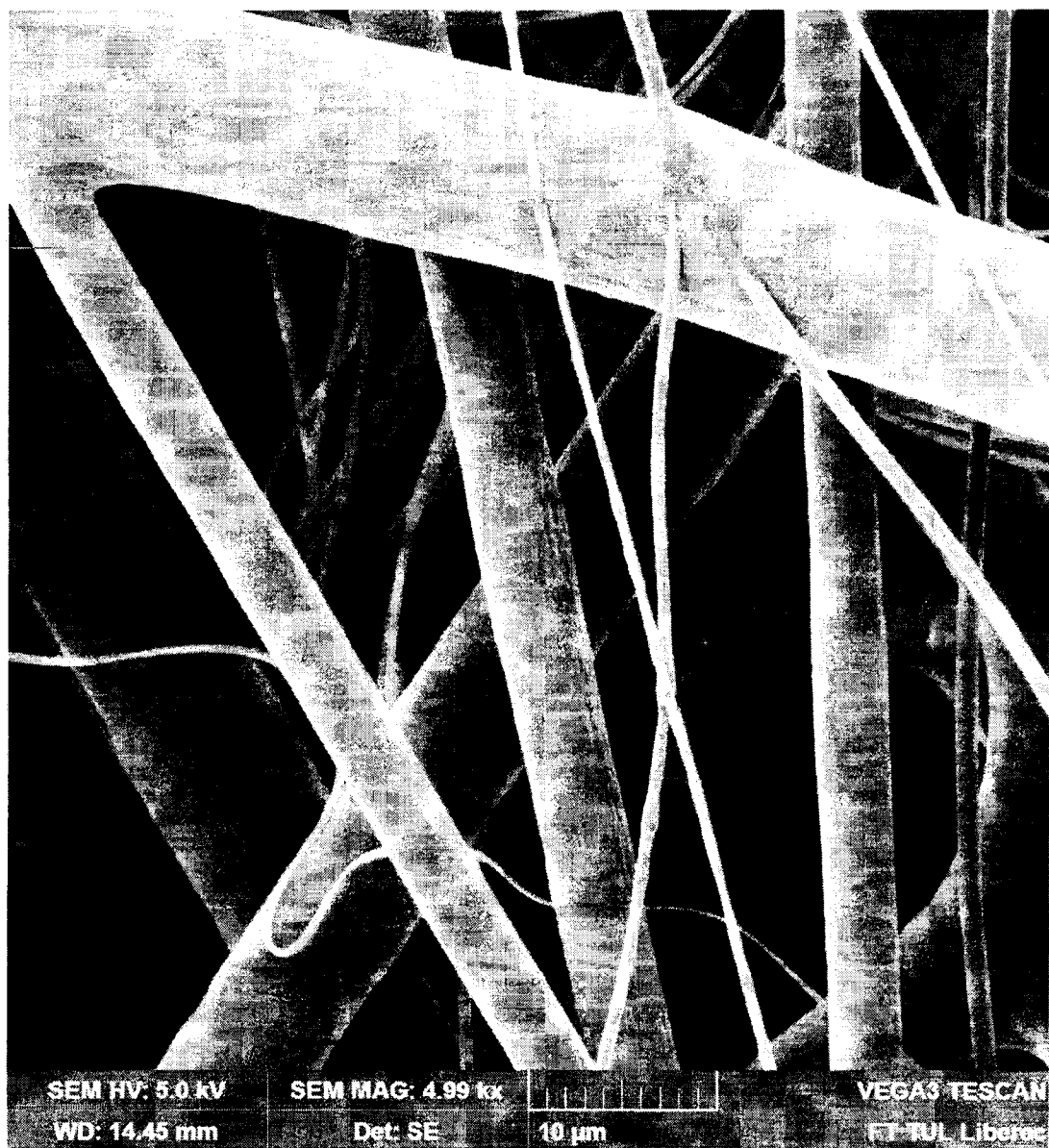
Obr. 2



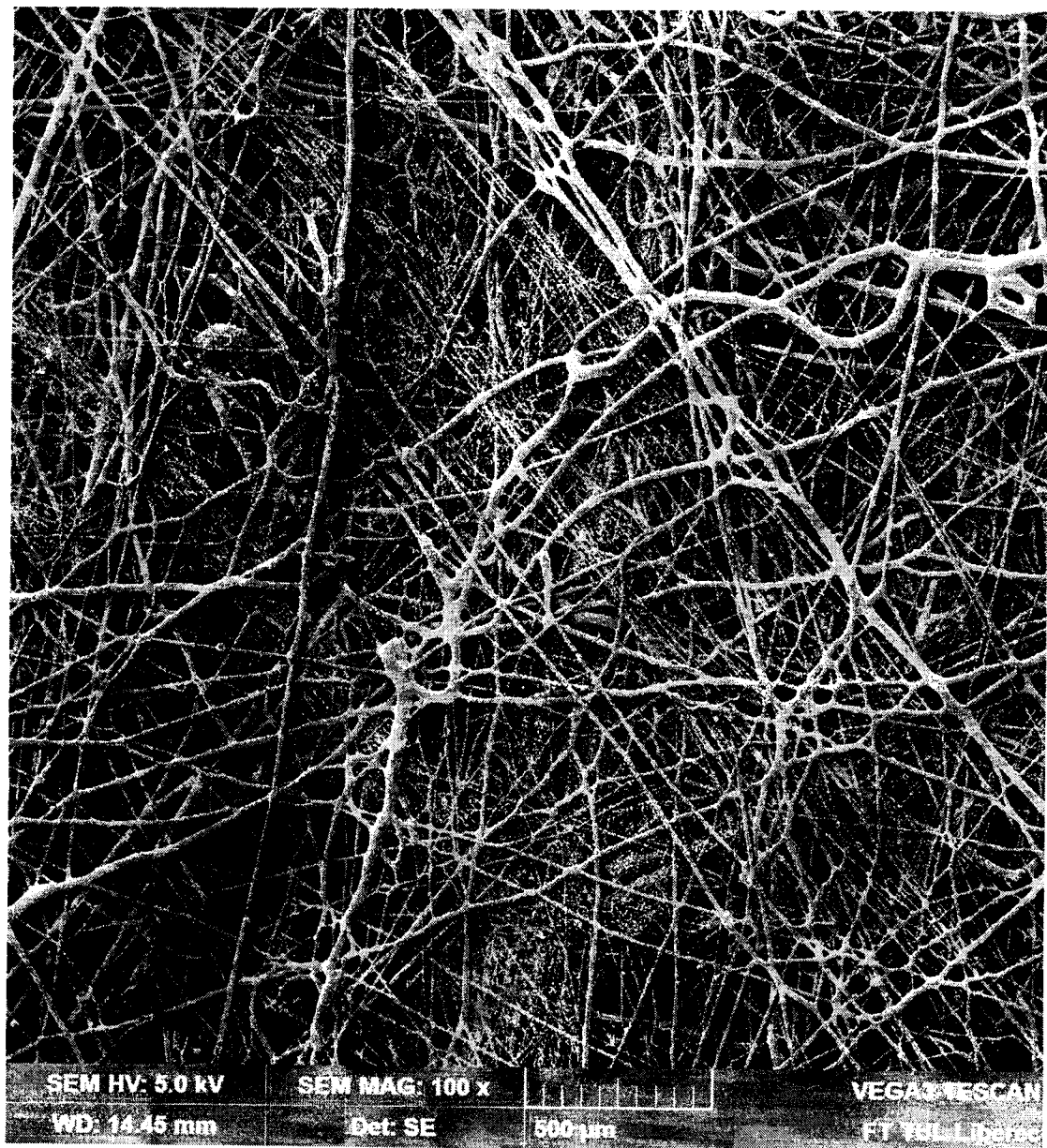
Obr. 3



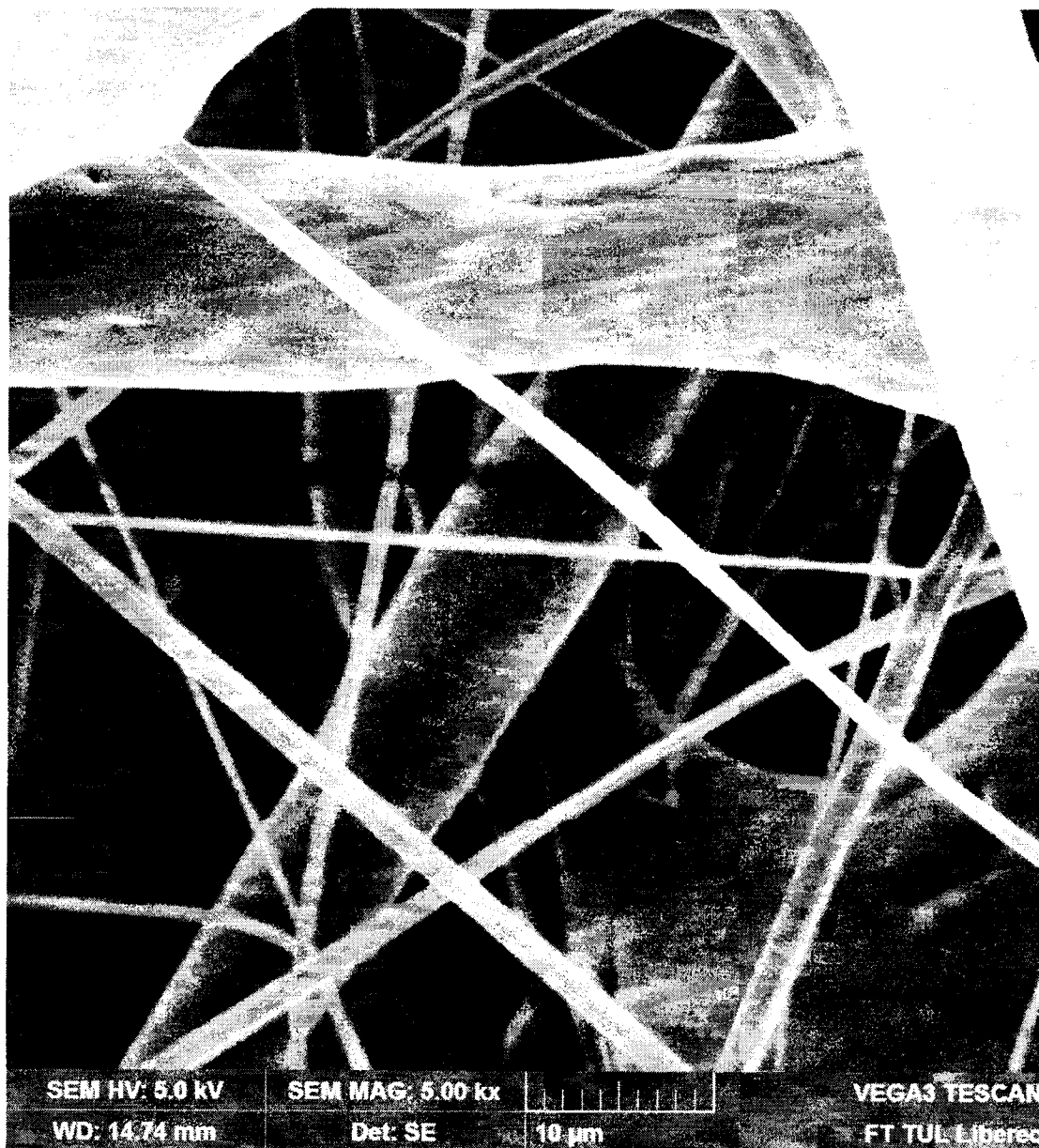
Obr. 4



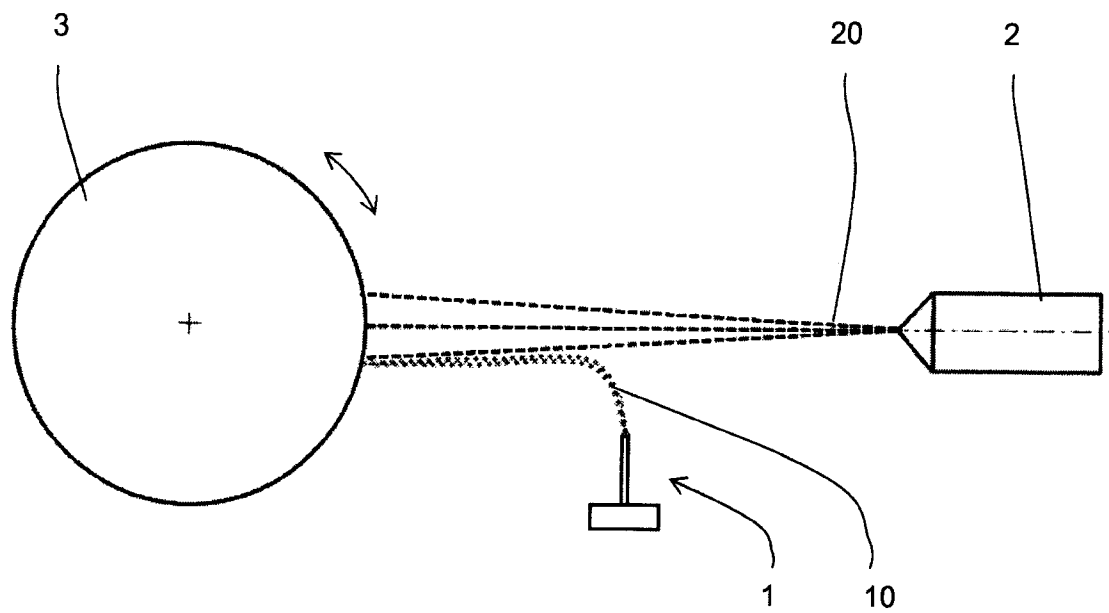
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

Konec dokumentu

Příloha č. 7

Vyslouzilova, Lucie; Buzgo, Matej; Pokorny, Pavel; et al.: Needleless coaxial electrospinning: A novel approach to mass production of coaxial nanofibers, INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS Volume: 516 Issue: 1-2 Pages: 293-300 Published: JAN 10 2017 (IF 3,649)

Patentová přihláška: Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu.



Needleless coaxial electrospinning: A novel approach to mass production of coaxial nanofibers



Lucie Vysloužilová^{a,1}, Matej Buzgo^{b,c,d,1,*}, Pavel Pokorný^a, Jiří Chvojka^a,
Andrea Míčková^{b,c,d}, Michala Rampichová^{b,c,d}, Jiří Kula^e, Karel Pejchar^f, Martin Bílek^f,
David Lukáš^a, Evžen Amler^{b,c,d}

^a Department of Nonwovens, Technical University of Liberec Studentska 2, 461 17 Liberec, Czechia

^b Department of Biophysics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, V Úvalu 84, 150 06, Prague 5, Czechia

^c Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20, Prague 4, Czechia

^d University Centre for Energy Efficient Buildings, Czech Technical University in Prague, Trinecká 1024, 273 43, Bustehrad, Czechia

^e Department of Textile Evaluation, Technical University of Liberec, Studentska 2, 461 17 Liberec, Czechia

^f Department of Textile Machine Design, Technical University of Liberec, Studentska 2, 461 17 Liberec, Czechia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2016

Received in revised form 10 November 2016

Accepted 11 November 2016

Available online 13 November 2016

Keywords:

Core-shell nanofibers

Coaxial electrospinning

Needleless electrospinning

Fluorescent spectroscopy

ABSTRACT

Herein, we describe a simple spinneret setup for needleless coaxial electrospinning that exceeds the limited production capacity of current approaches. The proposed weir spinneret enables coaxial electrospinning from free liquid surface. This approach leads to the formation of coaxial nanofibers with higher and uniform shell/core ratio, which results in the possibility of better tuning of the degradation rate. The throughput and quality increase favor the broader application of coaxial nanofibers from weir spinnerets as systems for controlled drug delivery in regenerative medicine and tissue engineering.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrospinning is a recent fiber-forming nanotechnology that enables us to create submicron fibers drawn from polymer solutions and melts by electrical forces. Electrospinning technology can be divided into needle, needleless and core-shell methods (Lukáš et al., 2009). The electrospinning process affords the opportunity to engineer tissue engineering scaffolds with micro- to nanoscale topography and high porosity, similar to the natural extracellular matrix (ECM) (Li et al., 2005). Besides scaffolding function, electrospun nanofibers could be utilized for drug delivery of active molecules. The classical approach for preparation of nanofibers with incorporated growth factors is blend electrospinning. The polymer/drug composite is prepared by simple mixing of miscible solutions. Main constraint of using blend electrospinning for delivery of protein-based therapeutics is their denaturation in organic solvents. Biocompatible polymers (such as PCL, PLGA, PU etc.) supporting adhesion of cells are typically

hydrophobic and soluble in organic solvents and mixing of proteins with organic solvents decreases their activity (Puppi et al., 2010).

Coaxial electrospinning is a unique, sophisticated method of producing second generation nanofibers. It is an alternative way, which enables production of composite functionalized nanofibers with a strictly organized core/shell structure (Song et al., 2005). The spinning electrode of the apparatus for coaxial electrospinning consists of two capillaries coaxially placed together (Kalra et al., 2009). The polymeric fluids from the shell and core needle can be either miscible or immiscible, since the short time of fiber solidification significantly prevents mixing of fluids (Yu et al., 2004). Versatility of core/shell polymers and solvents enables incorporation of diverse bioactive substances including growth factors including bFGF (Sahoo et al., 2010), VEGF (Jia et al., 2011) and PDGF-bb (Zhang et al., 2013). Zhang et al. (2013) prepared two-layer coaxial nanofibrous composite from PEG-PLCL loaded by VEGF or PDGF-bb for vascular tissue engineering. The inner mesh loaded by VEGF and outer layer loaded by PDGF-bb showed dual release profile. They showed that the inner layer loaded by VEGF could accelerate proliferation of vascular endothelial cells during the first 6 days after seeding. On the other hand, the outer layer loaded by PDGF-bb stimulated proliferation after day 6. Such regeneration pattern was shown as favorable for vascular

* Corresponding author at: University Centre for Energy Efficient Buildings, Czech Technical University in Prague, Trinecká 1024, 273 43, Bustehrad, Czechia.

E-mail address: buzgo@labdemo.cz (M. Buzgo).

¹ Both authors contributed to this work equally.

regeneration *in vivo*. The results of drug release studies with coaxial nanofibers show versatility of the method. Main advantages of the process are possibility of core/shell nanofiber formation from miscible and immiscible polymers, high loading capacity of bioactive molecules, sustained release from fibers and less harsh process enabling delivery of susceptible compounds.

However, the main disadvantage of this method is its very low production rate. As described previously, one needle of a spinneret produces only one polymer jet as a rule. As a result, the productivity of this method cannot be higher than 300 mg/h (Niu et al., 2009). This productivity can be enhanced by increasing the number of needles (Ding et al., 2004); however, this so-called multiple-jet setup has problems with deformation of the electric field and aberrant electrospinning processes and it requires regular cleaning. A revolutionary idea for a needleless electrospinning method that can raise the productivity by orders of magnitude without any need for needle-spinning electrodes was proposed by Yarin and Zussman (2004). Recently, an idea based on the observation that jets rise up even from unconstrained and nearly flat liquid surfaces (Jirsak et al., 2005) has led to mass production of

nanofibers and commercialization of the developed technology under the brand name Nanospider™.

The principle of needle coaxial electrospinning is based on the creation of a composite droplet in the orifice of a spinneret consisting of two coaxially arranged capillaries. The composite droplet forms a composite Taylor cone that pulls up both the shell polymer and the core polymer. Then, both polymers together are drawn and elongated by the electrospinning jet and collected on the grounded collector (Reznik et al., 2006). As mentioned above, a clear disadvantage of this needle coaxial method is its low productivity. Clearly, the small spinning area in this setup, i.e., the area of the spinneret orifice, cannot produce more than one jet.

In this study, we have developed and introduced a novel weir spinneret for needleless coaxial electrospinning. The principle of the spinneret is based on electrospinning from an unconstrained liquid surface of a flowing polymeric bilayer that cascades over a metallic threshold. Such an approach leads to a significant increase in coaxial nanofiber production. In addition, the produced nanofibers usually have better stability, resulting in well-regulated and prolonged drug release. This is a necessary property for broader

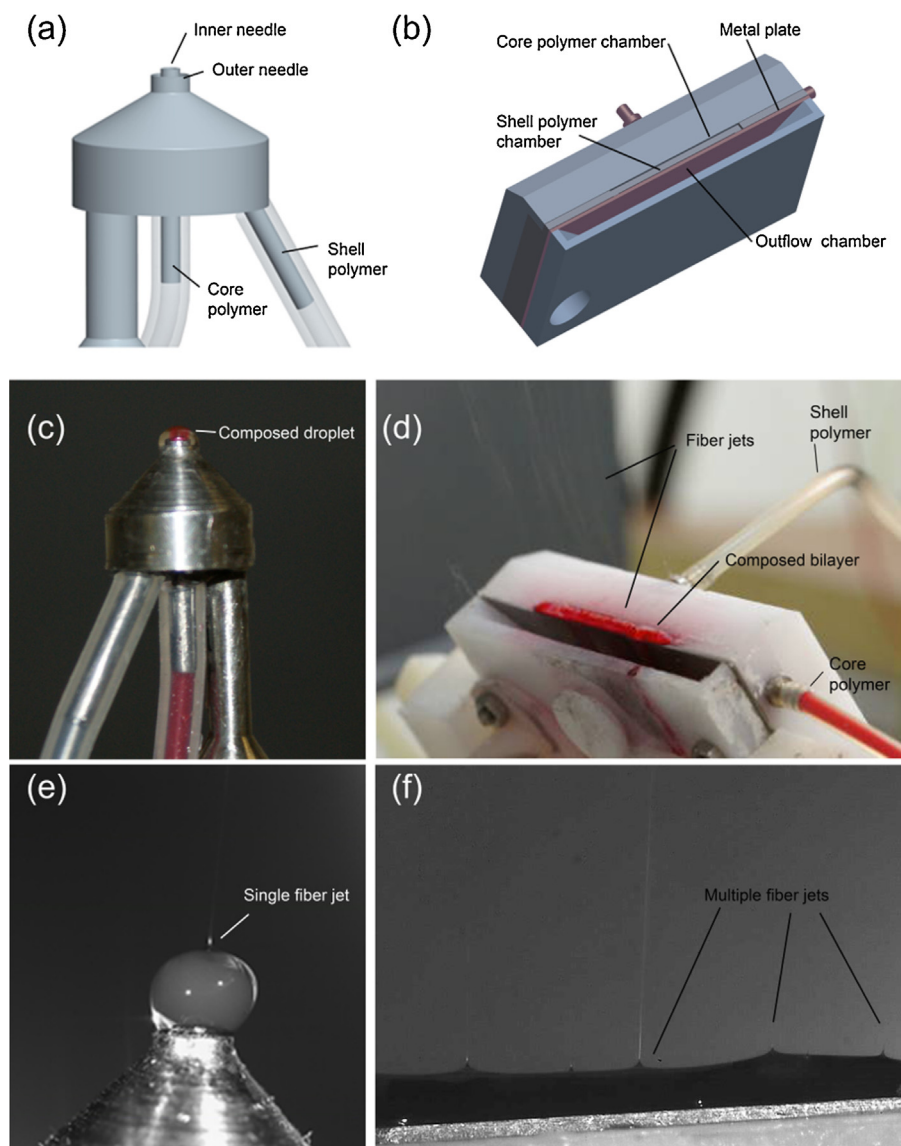


Fig. 1. Coaxial spinnerets: (a) model of the coaxial needle spinneret, (b) model of the needleless coaxial (weir) spinneret, (c) image of the needle coaxial spinneret with a polymeric droplet, (d) image of the needleless coaxial spinneret with a polymeric bilayer, (e) image of the polymer droplet on the needle coaxial spinneret captured by a high-speed camera, and (f) image of the bilayer on the needleless coaxial spinneret captured by a high-speed camera.

application of coaxial nanofibers as drug release systems in tissue engineering and regenerative medicine.

2. Material and methods

2.1. Needle coaxial electrospinning electrode

The needle coaxial spinneret (Fig. 1a) is composed of two coaxially arranged needles. The inner needle protrudes from the orifice of the outer one by 1/3 of the outer needle diameter. Core and shell polymeric liquids are delivered to core and shell capillary compartment and composite droplet is formed on the orifice of spinneret.

2.2. Needleless coaxial electrospinning electrode

The proposed needleless coaxial spinning electrode is 800 mm long and 30 mm thick and consists of three chambers (Fig. 1b). The first chamber has a volume of 1 ml and is fed with the shell polymer solution. The next chamber has a volume of 1 ml and is supplied with the core polymer solution, and the last chamber is for the outflow of excess polymer mixture. Located between the feeding chambers and the outflow chamber is a metal plate with a thickness of 2 mm. The shell polymer solution floats above the core polymer solution, and a thin bilayer of polymeric materials is formed. The metal plate between the feeding chambers and the outflow chamber was connected to the positive pole of the high-voltage power supply.

2.3. Electrospinning setup

The custom made electrospinning apparatus (Fig. 2) consisted of either a needle or needleless coaxial spinning electrode, a high-voltage power supply (SL100, Spellman), and a collector composed of a metallic disc (radius of 150 mm, thickness of 3 mm, and distance between collector and spinning electrode of 120 mm). Two syringe pumps (KDS-100-CE, KD Scientific Inc.) were used to deliver the core and shell solutions. For needle coaxial electrospinning, the feed rate for the core polymer was 2.5 ml/h and the feed rate for the shell polymer was 4 ml/h. For needleless electrospinning, the feed rates were higher: the feed rate for the shell polymer was 12 ml/h and that for the core polymer was 8 ml/h. A high-voltage power supply was used to generate voltages of up to 55 kV, and a spunbond nonwoven substrate was used to collect the nanofibers. The nanofibers were prepared from water-soluble polyvinyl alcohol (PVA, Sloviol R16, Novacke Chemické Zavody, SK). A 12% (w/v) PVA solution prepared by dissolving PVA in distilled

water was used as the shell polymer. The core solution consisted of 5% (w/v) PVA, and red food pigment was added to facilitate better observation of the electrospinning process. Core polymer is not spinnable alone and incorporation of pigment is connected with successful coaxial electrospinning process with shell polymer. All electrospinning processes were performed at room temperature, 21 °C, and at 45% humidity.

2.4. Monitoring of electrospinning process

Morphology of liquid phase on spinnerets under electric field were visualized using high speed video camera (iSPEED 3, Olympus). Observation was focused on self-organization of Taylor cones. Number of Taylor cones on spinneret were calculated in ImageJ software. Productivity of process was monitored utilizing gravimetric measurement of fibers at 15 min time interval. The mean productivity was calculated from 5 independent experiments. In order to evaluate the surface morphology of fibrous samples was analyzed using SEM. Gold coated samples were visualized on Phenom G2 electron microscope (FEI) in BSE mode. The detailed images of nanofibers were obtained on Vega 3 SBU (Tescan) in SE mode. The diameters of the coaxial nanofibers were measured using the image analysis software NIS Elements 0.3.

2.5. Confocal microscopy and fiber coaxiality

The core-shell morphology of the prepared nanofibers was investigated using confocal laser scanning microscopy. To verify the structure, another fibrous mesh with specific fluorophores in core and shell polymers was prepared. For this mesh, a shell solution of 12% (w/v) PVA was mixed with FITC-dextran (2 mg/ml, MW 10000, Sigma Aldrich). The nanofiber core consisted of 5% (w/v) PVA with an added protein conjugated with phycoerythrin and Alexa Fluor 700 (IgG-PE-AF700, 0, 5 mg/ml, Molecular Probes). Phycoerythrin absorbs blue light (420–700 nm) as a donor, and when it is in proximity to any acceptor (e.g., the red-absorbing dye Alexa Fluor 700), a red shift in the emission spectrum occurs as a result of Förster resonance energy transfer. This phenomenon is accompanied by the appearance of acceptor emission. These spectral properties of the selected fluorophores thus allowed single-wavelength excitation of both fluorophores (i.e., excitation at 488 nm for both FITC-dextran and IgG-PE-AF700). The difference between the emission spectra of FITC-dextran and IgG-PE-AF700 enables the signals from the nanofiber core and shell to be distinguished. The distribution of encapsulated FITC-dextran and IgG-PE-AF700 within the nanofibers prepared using needle and needleless coaxial electrospinning were observed using a Zeiss LSM 5 DUO confocal laser scanning microscope (FITC-dextran has $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm; IgG-PE-AF700 has $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 780$ nm).

2.6. Release from samples with different core/shell crosslinking

In order to characterize release from core and shell of nanofibers and verify coaxiality of fibers, another batch coaxial nanofibers was prepared. Solution of 12% (w/v) PVA without additions of crosslinking agents was utilized for production of water soluble shell part of nanofibers. Solution of 5% (w/v) PVA without additions of crosslinking agents was utilized for production of water soluble core part of nanofibers. Solution of 12% (w/v) PVA with glyoxal (PVA glyoxal ratio 4:1 (w/w)) and 3% (w/v) H_3PO_4 was utilized for production of water insoluble shell crosslinked shell part of nanofibers. Solution of 5% (w/v) PVA with glyoxal 20% (PVA glyoxal ratio 4:1 (w/w)) and 3% (w/v) H_3PO_4 was utilized for production of water insoluble crosslinked core part of nanofibers. Core of nanofibers was enriched by 2 mg/ml TRITC-dextran (MW

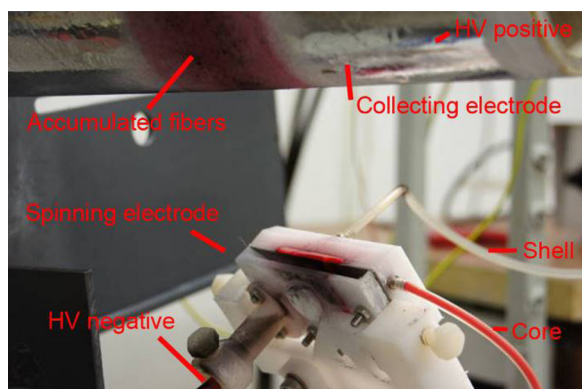


Fig. 2. Image of electrospinning setup. The custom made electrospinning setup consisted of spinning electrode, collector, positive and negative power supply and syringe pumps for core and shell polymer delivery.

Table 1
Characteristics of Needle and Needleless Electrospinning.

Table 1	Number of Taylor cones formed	Flow rate	Fiber production	Mean fiber diameter
Needle coaxial electrospinning	1	Shell (4 ml/h), Core (2.5 ml/h)	0.64 ± 0.03 g/h	330 ± 60 nm
Needleless coaxial electrospinning	40 ± 8	Shell (12 ml/h), Core (8 ml/h)	2.67 ± 0.99 g/h	270 ± 60 nm

10000, Sigma) and shell of fibers was labeled by 2 mg/ml FITC-dextran (MW 10000, Sigma).

Core/shell nanofibers prepared either by needle and needleless electrospinning were produced by various mixtures of crosslinked and non-crosslinked PVA: 12% PVA crosslinked shell/5% PVA crosslinked core, 12% PVA non-crosslinked shell/5% PVA cross-linked core, 12% PVA crosslinked shell/5% PVA non-crosslinked core. These groups were produced both by needle and needleless coaxial electrospinning.

After the electrospinning process, all samples were crosslinked (10 min, 130 °C), cut into patches with diameters of 1 cm and incubated with 1 ml of TBS buffer at room temperature. At specific intervals, the TBS buffer was withdrawn and replaced with fresh buffer. The time interval was chosen in order to maintain a balance between the release of detectable amounts of FITC-dextran and TRITC-dextran and maintenance of the sink conditions. Drug release was quantified using fluorescence spectroscopy. Briefly, 200 µl of the samples and blank samples were measured on a multiplate fluorescence reader (Synergy HT; FITC-dextran λ_{ex} = 480–500 nm, λ_{em} = 520–540 nm; TRITC-dextran λ_{ex} = 560–580 nm, λ_{em} = 600–620 nm), and then background subtraction was performed. All values are presented as the mean ± SD of at least four independent experiments. The cumulative release profile of FITC-dextran and TRITC-dextran was obtained.

3. Results and discussion

3.1. Needle and needleless coaxial electrospinning

Coaxial nanofibers were produced utilizing either needle or needleless spinnerets. Needle spinneret is composed of two coaxially arranged capillaries. Core and shell polymers produce composite drop on the orifice of spinneret. An external electrostatic field pulls up both the shell polymer and the core polymer (Fig. 1c). Both polymers together are drawn and elongated by the coaxial electrospinning jet and collected on the grounded collector. Structure of needle coaxial spinneret was previously described by numerous groups (Sun et al., 2003; Teo and Ramakrishna, 2006; Zhang et al., 2004) including our group (Buzgo et al., 2013; Lukáš et al., 2009; Mickova et al., 2012). Coaxial needle arrangement is a standard spinneret composition for production of shell nanofibers.

In this manuscript we introduce a novel needleless coaxial spinneret. The needleless coaxial spinner is a unique new electrospinning setup capable of producing coaxial nanofibers with core-shell structures from the unconstrained liquid surfaces of polymeric bilayers. The bilayer consists of the core polymer covered by a thin layer of the shell polymer. The external electrostatic field induces the creation of Taylor cones on the top layer. As the electrostatic forces increase, polymer jets are created from these Taylor cones. The polymer jets of the shell polymer draw up the core polymer from the bilayer, and nanofibers with a core/shell morphology are produced, as in the classic coaxial electrospinning setup (Fig. 1d). Recently, the pyramid shaped spinneret enabling needleless core-shell electrospinning was developed (Jiang et al., 2013). Similarly, linear-slit electrode was described by Yan et al. (2015) for needleless production of core/shell nanofibers. Forward et. al (Forward et al., 2013) prepared coaxial nanofibers by formation of bi-liquid structure on rotating

wire electrode. Our approach delivers a simplified construction of electrodes and extends the application potential of system and scalability.

The parameters of the process are shown in Table 1. The electrospinning process was examined using a high-speed video camera. In the needle coaxial electrospinning process, a single Taylor cone emerged in the surface of the composite droplet (Fig. 1e). On other hand, under an applied electric field, more than 40 Taylor cones emerged on the surface of the bilayer in the needleless coaxial setup (Table 1). This increase in the number of Taylor cones strongly enhances production rate of the system. The production rate increased from 0.64 ± 0.03 g/h for needle coaxial electrospinning to 2.67 ± 0.99 g/h for needleless coaxial electrospinning, which is an increase in the production rate of approximately four times. It is worth emphasizing that the production rate is dependent on the weir length, which was only 5 cm in our spinneret. Naturally, a longer weir would result in a proportionally higher production rate. The approach is similar to the process implemented by the Nanospider™ device for production of non-coaxial monolithic nanofibers and has great potential for enabling mass production of coaxial nanofibers. Another important result is that the extension of spinning area enables production of a more homogenous fibrous mesh (Burger et al., 2006; Zhou et al., 2009).

The morphologies of the nanofibrous layers prepared both using needle and needleless coaxial electrospinning were examined using scanning electron microscopy (SEM), as shown in Fig. 3. Fig. 3a shows the nanofibers produced using needle coaxial electrospinning, while Fig. 3b shows the nanofibers produced using the needleless coaxial spinner. The average diameter of the nanofibers from the coaxial needle spinner was 330 ± 60 nm, and that from the needleless coaxial spinner was 270 ± 60 nm. The coaxial nanofibers produced with the needleless coaxial technology were fine in comparison to those produced with needle coaxial electrospinning, which is preferable for biological applications (Tian et al., 2008). The SEM images show no defects on the fibrous mesh in case of both needle and needleless electrospinning process. This indicates, that the non-spinnable core phase (5% PVA) is embedded in spinnable shell phase (12% PVA). The core phase is not emitted from electrode and does not form non-fibrous defects on the surface of fibrous mesh. High homogeneity of fibers combined with low abundance of defect indicates proper coaxial electrospinning process. The fiber surface is smooth and core polymer was not observable even under higher magnifications (Fig. 3c and d).

3.2. Needle and needleless coaxial electrospinning enables production of core/shell nanofibers

In order to characterize core/shell morphology of prepared nanofibers, nanofibrous sample with FITC-dextran was embedded in shell of fibers. Core of nanofibers was labeled by IgG-PE-AF700. Such combination of fluorophores enabled excitation of both labels at single wavelength. Confocal microscopy images show the core-shell morphology of the prepared nanofibrous meshes. Fig. 4 shows detailed confocal image and Supplementary Fig. 1 shows morphology of fibers with lower magnification. The micrograph shows the signal of the shell-embedded fluorophore (FITC-dextran,

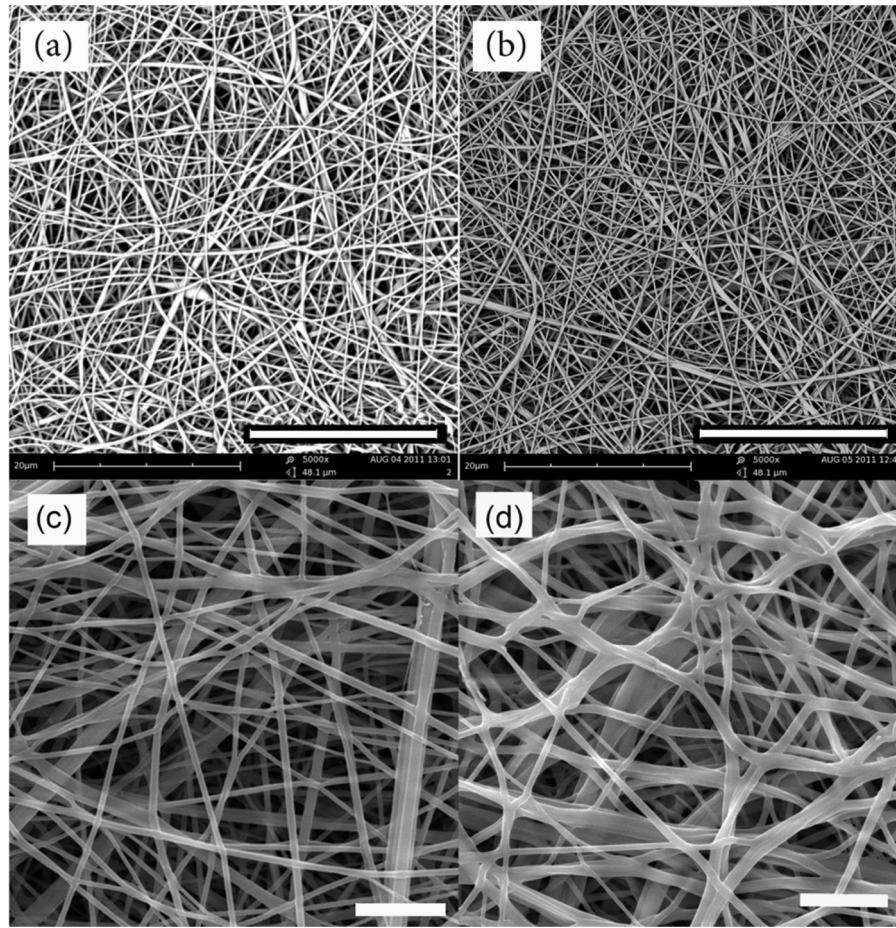


Fig. 3. SEM images of coaxial nanofibers: (a) morphology of fibrous mesh produced by needle coaxial electrospinning and (b) morphology of fibrous mesh produced by needleless coaxial electrospinning. Scale bar indicates 20 μm . Detailed morphology of fibers shows smooth fiber surface of needle (c) and needleless (d) coaxial fibers. Scale bar indicates 5 μm .

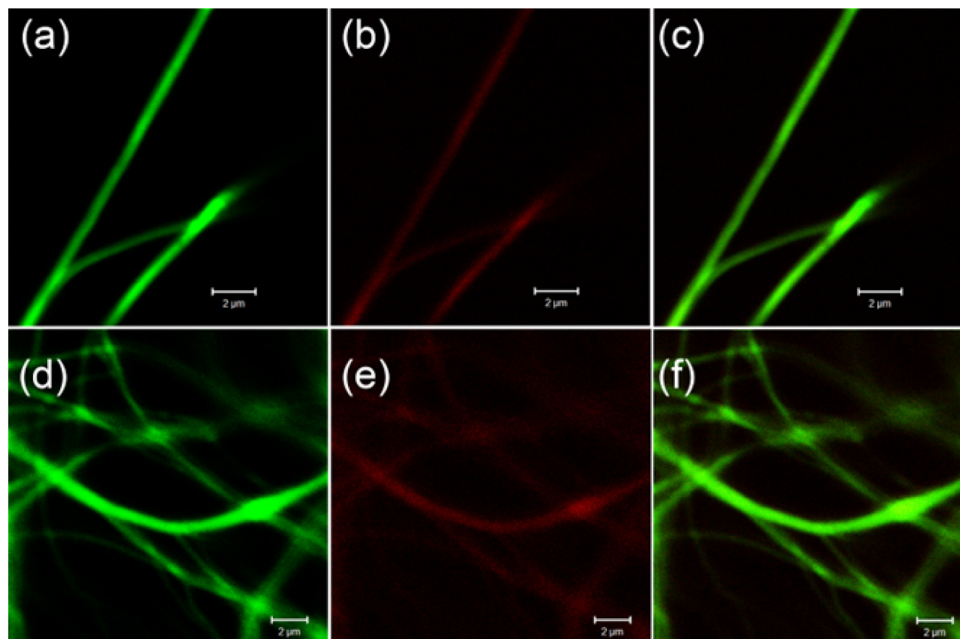


Fig. 4. Visualization of core/shell structure of nanofibers produced by (a–c) needle electrospinning and (d–f) needleless electrospinning. (a, d) Signal of shell-incorporated FITC-dextran. (b, e) Signal of core-incorporated IgG-PE-AF700. (c, f) Combination of both signals.

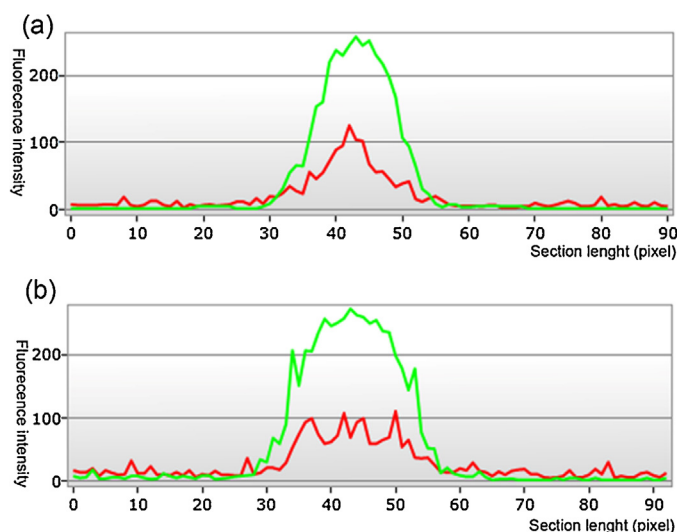


Fig. 5. Signal intensity profiles of fluorophores for (a) needle electrospinning and (b) needleless electrospinning. Fluorescence intensity profiles of the shell FITC-dextran (green) and core TRITC-dextran (red). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

green) and the signal of the core-embedded fluorophore (IgG-PE-AF700, red), as well as both signals combined. The signal intensity of the IgG-PE-AF700 embedded in the core of the coaxial nanofibers is lower because of energy loss during resonance transfer, its lower quantum yield, and signal loss caused by crossing the barrier between the core and shell polymers. The signal intensity profile of the coaxial fibers from the needle spinner (Fig. 5A) shows that the signal from the shell polymer (FITC-dextran) increased near the periphery of the nanofibers and peaked in the central part of the fibers. Interestingly, the signal from the core polymer (IgG-PE-AF700) had a delayed increase in the fluorescence intensity, and the signal peaked in the central part of the fibers. In order to characterize these peaks, the full width at half-maximum (FWHM) was determined for both the core and shell intensity profiles. The ratio of shell FWHM to core FWHM of the coaxial fibers from the needle spinner was 1.64 ± 0.35 . These results demonstrate that the shell polymer layer is thicker than the core polymer layer and confirm the coaxial morphology of the prepared fibers. A similar distribution profile was observed for the coaxial fibers from the needleless spinner, as well (Fig. 5B). In this case, the ratio of shell to core FWHM was 1.35 ± 0.13 . These results indicate that the needleless coaxial apparatus enables the production of nanofibers with coaxial morphologies.

3.3. Crosslinking of core and shell polymer results in distinct release profiles

To further confirm that the novel needleless electrospinning system is able to produce coaxial nanofibers, we profiled the release of FITC-dextran from the shell and of TRITC-dextran from the core of coaxial meshes produced by the needle and needleless systems. The release kinetics of the embedded content is determined by the form of interaction between the fiber and the drug. In a biodegradable system, the drug may be released by diffusion as well as degradation of the material. A recent work has argued that the release mechanism is governed by desorption from nanopores on the surface of the fibers rather than by a solid-state diffusion mechanism (Srikar et al., 2008). For non-biodegradable materials, the release process depends on the diffusion rate of the molecule from the fibers (Gandhi et al., 2009). On other hand, for biodegradable materials the process additionally depends on the

kinetics of the material degradation, where the release rate is significantly higher for rapidly degradable materials (Sill and von Recum, 2008; Zeng et al., 2005). In addition, the release from the nanofibers depends significantly on the physicochemical properties of the delivered substances, like the molecular weight, hydrophobicity, and charge of the molecule (Frank et al., 2005; Gandhi et al., 2009). In particular, drug-polymer-solvent compatibility plays a crucial role in the process: hydrophobic drugs should be combined with hydrophobic polymers, and hydrophilic drugs, with hydrophilic polymers. Otherwise, the drug cannot completely dissolve in the polymer solution and becomes noncovalently attached to the nanofiber surface, causing intense burst release of the drug (Zeng et al., 2005). To evaluate the fibers produced here, we used both FITC-dextran and TRITC-dextran with molecular weights of 10,000 to avoid the possible influence of different physicochemical parameters of the fluorophores on the release kinetics. In addition, hydrophilic molecules with higher molecular weights will be more homogeneously dispersed in hydrophilic PVA fibers, and thus their release kinetics will depend on the degradation rate of the polymer.

Nanofibrous layers were electrospun using needle and needleless coaxial electrospinning with various combinations of cross-linked (insoluble in water) and non-cross-linked PVA (soluble in water) in the core and shell. Samples containing both cross-linked shell and cross-linked core PVA (called needle shell-crosslinked/core-crosslinked and needleless shell-crosslinked/core-crosslinked) were expected to release both fluorophores at similar rates. The crosslinking reduces both degradation and diffusion rate from fibers and should eliminate the burst release and prolong the release rate. The obtained release profiles of samples with a cross-linked shell and a cross-linked core (Fig. 6A, B) show sustained release of the fluorophores. The fluorophores were released from the samples with similar kinetics. Because the release profiles of both fluorophores were similar, the release rate must not be affected by the fluorophore used, and thus these profiles can serve as a positive control. Fibrous meshes containing a cross-linked shell and a non-cross-linked core (needle shell-crosslinked/core-noncrosslinked and needleless shell-crosslinked/core-noncrosslinked) are supposed to release the soluble-core-encapsulated TRITC-dextran faster than the FITC-dextran embedded in the insoluble shell. Samples with a cross-linked shell and a non-cross-linked core (Fig. 6C, D) released the shell fluorophore more slowly and the core TRITC-dextran faster. This is caused by limited stability of core phase in aqueous environment. The core is degraded and the TRITC-dextran embedded in core phase is released from the fibers. The key limiting step for release is diffusion of molecule from the core through the shell phase. On the other hand, the shell polymer is crosslinked and the embedded FITC-dextran is released in slower manner than the core TRITC-dextran. The crosslinking limits the degradation of shell PVA phase and limits the diffusion due to lower swelling compared to non-crosslinked PVA. Finally, fibrous meshes consisting of a non-cross-linked shell and a cross-linked core (needle shell-noncrosslinked/core-crosslinked and needleless shell-noncrosslinked/core-crosslinked) were expected to release the insoluble-core-encapsulated TRITC-dextran slower than the FITC-dextran embedded in the non-cross-linked, soluble shell. Interestingly, in samples with non-cross-linked shells and cross-linked cores (Fig. 6E, F), the release of the fluorophores was altered: FITC-dextran was released faster from the shell and TRITC-dextran showed a more sustained release from the core. This indicates, that the shell of fibers made of non-crosslinked PVA was unstable in aqueous environment and was dissolved during the first days of incubation. The crosslinked core was stable and release of TRITC-dextran encapsulated in core was prolonged due to higher stability of core polymer and limited diffusion. However, core of nanofibers prepared by needleless

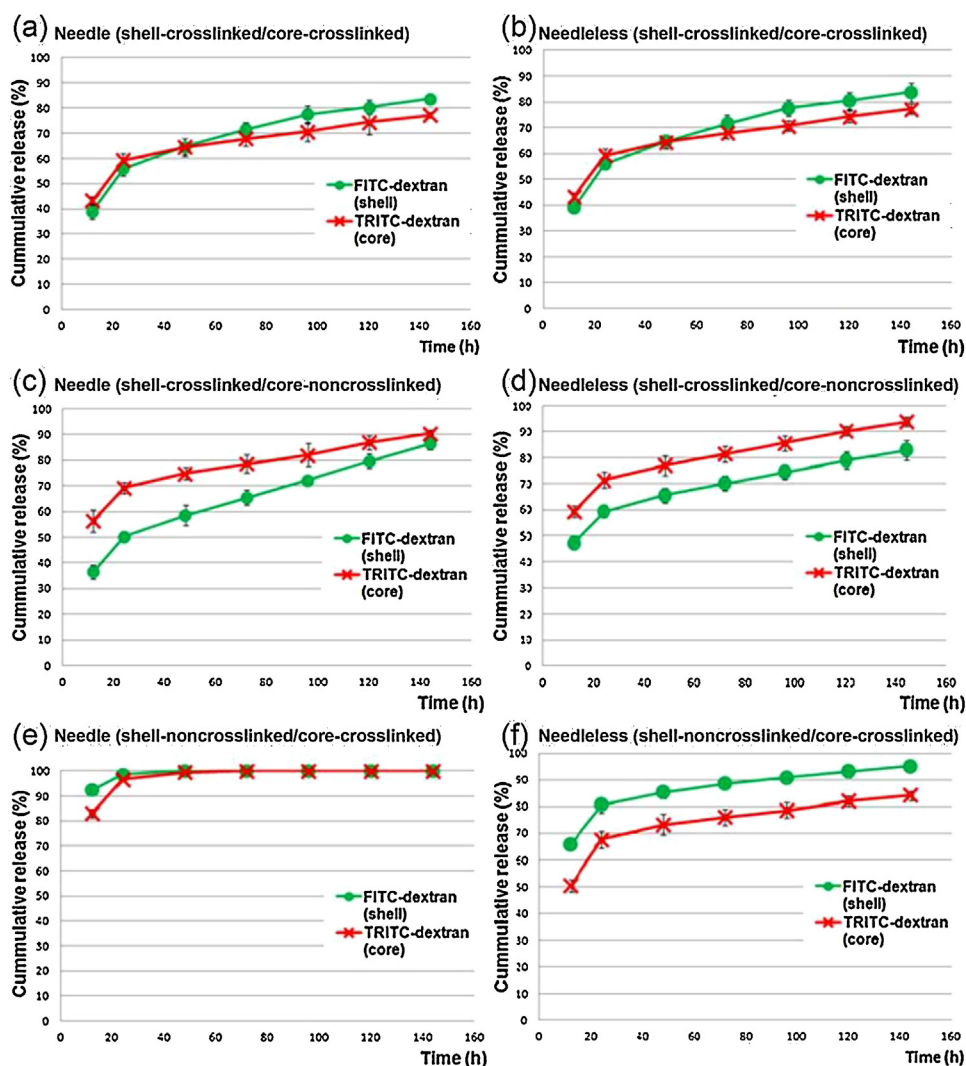


Fig. 6. Cumulative release profile of fluorophores incorporated to either the core (TRITC-dextran) or shell (FITC-dextran) of the coaxial nanofibers. The nanofibers were produced either by (a, c, e) needle coaxial electrospinning or (b, d, f) needleless coaxial electrospinning. C indicates cross-linked PVA, N indicates non-cross-linked PVA. Shell-crosslinked/core-crosslinked indicates a cross-linked shell and a cross-linked core PVA by glyoxal.

coaxial electrospinning (needleless shell-noncrosslinked/core-crosslinked) were more stable than core of fibers produced by needle electrospinning (needle shell-noncrosslinked/core-crosslinked). This indicates that there was a higher amount of the core polymer in the coaxial nanofibers produced by needleless coaxial spinning.

In addition, similar release profiles were observed for the nanofibers produced by needle and needleless coaxial electrospinning. The release from fibers made by standard needle coaxial electrospinning method was similar to fibers made by needleless coaxial spinning method indicating similar morphology and release properties of fibrous mesh prepared by these two methods. This feature is important for simple transfer of experimental protocols from needle to needleless electrodes. Nevertheless, as is indicated by higher stability of core phase in Needleless N/C group, the needleless spinning method supports encapsulation of higher amount of core polymer, which may result in improved encapsulation efficacy.

The results of the release study were consistent with our expectations. Specifically, it was demonstrated that the core (5% PVA) and shell (12% PVA) polymers form separate layers of coaxial fibers and that the stability of each layer could be regulated separately by controlling the cross-linking. Our experiments

showed that coaxial nanofibers were formed by both needle and needleless coaxial electrospinning. This finding was confirmed by both the different localization of the core and shell fluorophores observed using confocal microscopy and by the results of the release study, where the nanofiber meshes prepared using needle and needleless coaxial electrospinning released their fluorophores differently depending on the cross-linking of either the core or shell.

4. Conclusion

In conclusion, we proved that the novel spinneret enabled the production of coaxial nanofibers on scales larger than the laboratory scale. The proposed weir spinneret enables formation of bi-liquid layer on the top of linear spinneret and supports formation of coaxial nanofibers by needleless electrospinning. The increase of fiber production capacity was demonstrated by increase in production capacity compared to needle coaxial spinneret. In addition, we have demonstrated the core/shell morphology of fibers and possibility to use such fibers for time-regulated release of model molecules. In addition, this novel approach led to the formation of coaxial nanofibers with a higher and uniform shell/core ratio. This better production uniformity

leads to the possibility of better degradation rate tuning. Notably, the nanofiber production rate can be easily increased by lengthening the spinneret weir. These parameters favor broader applications of coaxial nanofibers produced from weir spinnerets as systems for controlled drug delivery in regenerative medicine and tissue engineering.

Acknowledgment

This study has been supported by the Grant Agency of Charles University (Grants Nos. 1246314, 1262414, 1228214, 545313, the Czech Science Foundation Grant No. 15-15697S, the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Research Programs NPU I:LO1508 and NPU I:LO1309), the Ministry of Interior of the Czech Republic (program BV III/1-VS, No VI20152018010) and the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NT12156, MZ-VES project no.16-29680A and 16-28637A).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.034>.

References

- Burger, C., Hsiao, B.S., Chu, B., 2006. Nanofibrous materials and their applications. *Annu. Rev. Mater. Res.* 36, 333–368.
- Buzgo, M., Jakubova, R., Mickova, A., Rampichova, M., Prosecka, E., Kochova, P., Lukas, D., Amler, E., 2013. Time-regulated drug delivery system based on coaxially incorporated platelet alpha-granules for biomedical use. *Nanomedicine (Lond.)* 8, 1137–1154.
- Ding, B., Kimura, E., Sato, T., Fujita, S., Shiratori, S., 2004. Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning. *Polymer* 45, 1895–1902.
- Forward, K.M., Flores, A., Rutledge, G.C., 2013. Production of core/shell fibers by electrospinning from a free surface. *Chem. Eng. Sci.* 104, 250–259.
- Frank, A., Rath, S.K., Venkatraman, S.S., 2005. Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition. *J. Control. Release* 102, 333–344.
- Gandhi, M., Srikar, R., Yarin, A.L., Megaridis, C.M., Gemeinhart, R.A., 2009. Mechanistic examination of protein release from polymer nanofibers. *Mol. Pharm.* 6, 641–647.
- Jia, X., Zhao, C., Li, P., Zhang, H., Huang, Y., Li, H., Fan, J., Feng, W., Yuan, X., Fan, Y., 2011. Sustained release of VEGF by coaxial electrospun dextran/PLGA fibrous membranes in vascular tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 22, 1811–1827.
- Jiang, G., Zhang, S., Qin, X., 2013. High throughput of quality nanofibers via one stepped pyramid-shaped spinneret. *Mater. Lett.* 106, 56–58.
- Jirsak, O., Sanetrik, F., Lukas, D., Kotek, V., Martinova, L., Chaloupek, J., 2005. A Method of Nanofibres Production from a Polymer Solution Using Electrostatic Spinning and a Device for Carrying Out the Method, U.S. Patent No. WO2005024101.
- Kalra, V., Lee, J.H., Park, J.H., Marquez, M., Joo, Y.L., 2009. Confined assembly of asymmetric block-copolymer nanofibers via multiaxial jet electrospinning. *Small* 5, 2323–2332.
- Li, M., Mondrinos, M.J., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Weiss, A.S., Lelkes, P.I., 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 26, 5999–6008.
- Lukáš, D., Sarkar, A., Martinová, L., Vodsedálková, K., Lubasová, D., Chaloupek, J., Pokorný, P., Chvojka, J., Komárek, M., 2009. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Text. Prog.* 41, 59–140.
- Mickova, A., Buzgo, M., Benada, O., Rampichova, M., Fisar, Z., Filova, E., Tesarova, M., Lukas, D., Amler, E., 2012. Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules* 13, 952–962.
- Niu, H., Lin, T., Wang, X., 2009. Needleless electrospinning. I. A comparison of cylinder and disk nozzles. *J. Appl. Polym. Sci.* 114, 3524–3530.
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., Chiellini, E., 2010. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog. Polym. Sci.* 35, 403–440.
- Reznik, S.N., Yarin, A.L., Zussman, E., Bercovici, L., 2006. Evolution of a compound droplet attached to a core-shell nozzle under the action of a strong electric field. *Phys. Fluids* 18, 062101.
- Sahoo, S., Ang, L.T., Goh, J.C.-H., Toh, S.-L., 2010. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93A, 1539–1550.
- Sill, T.J., von Recum, H.A., 2008. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29, 1989–2006.
- Song, T., Zhang, Y., Zhou, T., Lim, C.T., Ramakrishna, S., Liu, B., 2005. Encapsulation of self-assembled FePt magnetic nanoparticles in PCL nanofibers by coaxial electrospinning. *Chem. Phys. Lett.* 415, 317–322.
- Srikar, R., Yarin, A.L., Megaridis, C.M., Bazilevsky, A.V., Kelley, E., 2008. Desorption-limited mechanism of release from polymer nanofibers. *Langmuir* 24, 965–974.
- Sun, Z.C., Zussman, E., Yarin, A.L., Wendorff, J.H., Greiner, A., 2003. Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Adv. Mater.* 15, 1929–.
- Teo, W.E., Ramakrishna, S., 2006. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* 17, R89–R106.
- Tian, F., Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Khademhosseini, A., Yokoyama, Y., Estrada, G.G., Kobayashi, H., 2008. Quantitative analysis of cell adhesion on aligned micro- and nanofibers. *J. Biomed. Mater. Res. A* 84A, 291–299.
- Yan, X., Marini, J., Mulligan, R., Deleault, A., Sharma, U., Brenner, M.P., Rutledge, G.C., Freyman, T., Pham, Q.P., 2015. Slit-surface electrospinning: a novel process developed for high-throughput fabrication of core-sheath fibers. *PLoS One* 10, e0125407.
- Yarin, A.L., Zussman, E., 2004. Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers. *Polymer* 45, 2977–2980.
- Yu, J.H., Fridrikh, S.V., Rutledge, G.C., 2004. Production of submicrometer diameter fibers by two-fluid electrospinning. *Adv. Mater. (Weinheim Ger.)* 16, 1562–.
- Zeng, J., Yang, L., Liang, Q., Zhang, X., Guan, H., Xu, X., Chen, X., Jing, X., 2005. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *J. Control. Release* 105, 43–51.
- Zhang, Y.Z., Huang, Z.M., Xu, X.J., Lim, C.T., Ramakrishna, S., 2004. Preparation of core-shell structured PCL-r-gelatin Bi-component nanofibers by coaxial electrospinning. *Chem. Mater.* 16, 3406–3409.
- Zhang, H., Jia, X., Han, F., Zhao, J., Zhao, Y., Fan, Y., Yuan, X., 2013. Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. *Biomaterials* 34, 2202–2212.
- Zhou, F.-L., Gong, R.-H., Porat, I., 2009. Mass production of nanofibre assemblies by electrostatic spinning. *Polym. Int.* 58, 331–342.

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-117

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.02.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **31.08.2016**

(Věstník č. 35/2016)

A61L 15/00 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)
A61F 13/00 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
B29C 39/12 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Technická univerzita v Liberci, Ústav pro
nanomateriály, pokročilé technologie a inovace,
Liberec, I-Staré Město, CZ
- (72) Původce:
MUDr. Ladislav Dzan, Liberec XIV, CZ
MUDr. Silvie Krchová, Liberec, CZ
MUDr. Jiří Chvojka, Ph.D., Liberec, CZ
prof. RNDr. David Lukáš, CSc., Liberec, CZ
doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D., Turnov,
CZ
Ing. Petr Mikeš, Ph.D., Mníšek u Liberce, CZ
Ing. Pavel Pokorný, Ph.D., Frýdlant v Čechách, CZ
Ing. Denisa Zálesáková, Jablonec nad Nisou,
Jablonecké Paseky, CZ
prof. RNDr. Oldřich Jirsák, CSc., Liberec 20, CZ
Bc. Filip Sanetník, Liberec 1, CZ
Ing. Věra Jenčová, Ph.D., Liberec 6, CZ
Ing. Ondřej Novák, Ph.D., Liberec, CZ
Mgr. Kateřina Pilařová, Ústí nad Labem, CZ
Mgr. Jana Horáková, Jablonné v Podještědí,
Markvartice, CZ
- (74) Zástupce:
RETROPATENT s.r.o., Mgr. Kamil Kolátor,
Dobiášova 1246/29, 460 06 Liberec VI

simuluje strukturu pars reticularis koria, a proto je ideální základnou pro reparaci a regeneraci tkání. PCL nanovláknenná vrstva je velmi flexibilní, a proto snadno přilne ke spodině rány. PCL nanovláknenné vrstvy vyrobené podle tohoto způsobu mají vysokou pórovitost a svou přístupností pro vzdušný kyslík usnadňují a urychlují hojení ran. Nanovláknenná struktura vyrobená podle tohoto způsobu znesnadňuje průchod buněk o velikosti bakterií, a tím působí jako antibakteriální bariéra.

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob výroby plošného útvaru z
biodegradabilních a biokompatibilních
nanovláken, především pro kryt kožních
ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu**

- (57) Anotace:
Vynález se týká způsobu pro výrobu nanovláknenné vrstvy vyrobené z čistého polykaprolaktonu (PCL), při kterém se nanovláknna ukládají na nosnou netkanou textilií metodou stejnosměrného nebo střídavého elektrického zvlákňování (DC elektrospinning nebo AC elektrospinning). Nanovláknenná PCL struktura vyrobená elektrospinningem, odstředivým zvlákňováním, technologií melt-blow nebo kombinací těchto technologií

Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu.

Oblast techniky

- 5 | Vynález se týká způsobu výroby nanovláknenné vrstvy vyrobené z čistých biodegradabilních a biokompatibilních polymerů (například polykaprolaktonu (PCL)), při kterém se nanovláknena ukládají na nosnou netkanou textilií metodou stejnosměrného nebo střídavého elektrického zvlákňování (DC elektrospinning nebo AC elektrospinning), odstředivého zvlákňování, meltblownu nebo pomocí
- 10 kombinace těchto technologií.

Vynález se dále týká zařízení k zajištění výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran

15 Dosavadní stav techniky

Jedním z revolučních materiálů moderní lékařské vědy jsou bezpochyby nanovláknena. Pro své specifické vlastnosti nacházejí uplatnění nejen v mnoha technických oborech, ale otevírají také nové možnosti v současné medicíně.

- 20 Nejpoužívanějším způsobem výroby nanovláken je tzv. elektrostatické zvlákňování (DC elektrospinning) účinkem zdrojů stejnosměrného vysokého napětí. Z polymerního roztoku nebo polymerní taveniny se pomocí elektrostatických sil utvářejí jemná vlákna, jejichž průměr se pohybuje v rozsahu nanometrů, tedy miliontinách milimetru. Díky tomu má nanovláknenný materiál velkou povrchovou plochu, je vysoce porézní a vyznačuje se extrémně nízkou
- 25 tuhostí.

Předmětem rozsáhlého výzkumu je uplatnění nanomateriálů v biomedicíně. Nanomateriály mohou být použity při výrobě umělých orgánů, kůže, krevních cév nebo hojících prostředků.

Odborníci se zabývají výrobou nanovláken z biokompatibilních materiálů, které svými vlastnostmi napodobují skutečné tkáně a organismus je schopen je po určité době vstřebat.

5 Testuje se uplatnění nanovláken jako matrice pro růst kmenových buněk a možnost inkorporovat do jejich vrstev různé bioaktivní materiály, např. růstové faktory nebo imunosupresiva. Nanovlákná vyrobená z biopolymerů mohou sloužit jako krycí materiál na rány obohacený o antibakteriální či jiné látky, které přispějí k rychlejšímu hojení rány.

10 Nicméně veškeré úpravy samotného kožního krytu (neboli scaffoldu) ať během jeho výroby nebo již hotového materiálu se zdají spíše nevýhodné. Zaprvé proces výroby značně prodlužují. Zároveň funkcionalizace scaffoldu jakýmkoliv biologickými látkami, ať se již jedná o výtažky z bylin nebo například osazení scaffoldu buňkami pacienta, znesnadňuje reprodukovatelnost výroby materiálu. Navíc tyto biologicky aktivní látky při výrobě nebo při dlouhodobém skladování
15 velmi často ztrácí svou aktivitu a jejich účinek se tudíž snižuje. Další překážkou, se kterou je nutné se vypořádat, je postupné řízené uvolňování léčivých látek z kožního krytu, alespoň do doby, než dojde k jeho výměně. Při osazení scaffoldu buňkami zase narážíme na problém, kdy je nutná biopsie pacientovy tkáně, kultivace jeho vlastních buněk in vitro a následné osazení scaffoldu. Toto je velmi
20 zdlouhavý a také nákladný proces.

Při funkcionalizaci scaffoldů jinými látkami, jako jsou například soli stříbra, o kterém je známo, že má antibakteriální účinky, je nutné velmi přesně odhadnout koncentraci dané látky. Při větších koncentracích je totiž stříbro toxické i pro buňky lidského těla a mohlo by dojít k odumírání pacientovy tkáně.

25 Výše uvedenými problémy a jejich řešením se zabývají různé patenty a odborné články, jako například:

1. J. Chong, T.T. Phan, I.J. Lim, Y.Z. Zhang, B.H. Bay, S. Ramakrishna, C.T. Lim, Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound

healing and layered dermal reconstitution, *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 321–330.

- Současným požadavkem na nosiče vhodné pro tkáňové inženýrství je biologicky rozložitelný scaffold uvnitř něhož mohou fibroblasty migrovat a proliferovat. Taková
- 5 umělá dermální vrstva musí přilnout k ráně a integrovat se do ní, což není u řady umělých kožních náhrad splněno. Vysoká cena současných umělých kožních náhrad omezuje četnost jejich aplikací jak u lékařů, tak u pacientů. V článku je navržen cenově efektivní kompozit sestávající z nanovláknenné vrstvy vytvořené
- 10 metodou elektrického zvlákňování přímo na polyuretanový kryt (TegadermTM 3M Medical) pro dermální hojení kožních ran. Buněčná kultura je nasazena na obou stranách nanovláknenné vrstvy a testována na adhezi fibroblastů a jejich proliferaci. V práci se předpokládalo, že fibroblasty osídlené trojrozměrné nanovláknenné struktury překryté přes ránu podpoří tvorbu dermis a umožní následnou re-
- 15 epitelizaci. Výsledky získané v této studii ukazují, že nanovláknenný scaffold z obou stran osídlený fibroblasty vykazoval dobrou buněčnou adhezi, růst a proliferaci. Je to úspěšný první krok pro aplikaci nanovláknenných materiálů jako vhodných trojrozměrných nosičů pro pěstování autogenních populací fibroblastů. Poznatky získané studií poskytují velký potenciál pro léčbu kožních ran pomocí aplikace vrstevnatých vláknenných prostředků.
- 20 Nevýhody:
- Osazování in vitro před vlastní aplikací, která neumožňuje okamžité použití scaffoldu.
 - Nanovláknenné struktury předpokládají reepitelizaci rány in situ bez nutnosti předchozí kultivace

25

 - Ideálně osazování scaffoldu vlastními buňkami – biopsie, kultivace – zdlouhavé, finančně náročné
 - Pokud buňky cizí, nebezpečí odmítnutí scaffoldu

2. X. Liu, T. Lin, J. Fang, G. Yao, H. Zhao, M. Dodson, X. Wang, In vivo wound healing and antibacterial performance of electrospun nanofibre membranes, Journal of Biomedical Materials Research Part A 94A (2010) 499 – 508.

V této práci autoři posuzovali 5 materiálů jako možné kandidáty na krytí ran: poly(vinyl alkohu) (PVA), poly (ε-caprolacton) (PCL), polyakrylonitril (PAN), poly(vinyliden fluorid-co-hexafluoropropen) (PVdF-HFP) a PAN-polyuretan (PEU). Autoři poukazují na hlavní vlastnosti, které by měl ideální kryt rány mít a to, že by měl napomáhat hojení rány a minimalizovat velikost jizvy. Proto by takový scaffold měl splňovat požadavky na to, aby chránil ránu před infekcí, aby umožňoval přísun vzduchu k ráně a zároveň odváděl přebytečné tekutiny z rány. Tyto vlastnosti vlastnosti mají scaffoldy připravené elektrostatickým zvlákňováním. Vyznačují se vysokou porozitou, což napomáhá odvádění tekutiny z rány. Zároveň jsou tyto póry dostatečně malé na to, aby zamezily vnikání bakterií do rány. Autoři článku pro svoje experimenty využili in vivo testování krytí na potkaních. Z jejich výsledků je patrné, že všechny použité materiály napomáhají hojení rány. Hydrofilní scaffoldy podporují proces hojení lépe, než hydrofobní. Větší porozita materiálu a tudíž větší prodyšnost vedou k lepšímu hojení rány. Dalším výsledkem této studie také bylo, že scaffoldy z PCL a PVdF-HFP oproti ostatním materiálům výrazně lépe přilnuly k ráně. To by mohla být u těchto scaffoldů výhodou, jelikož by nedocházelo k odlupování scaffoldu během procesů hojení, což by mohlo celý proces urychlit.

Nevýhody:

- Preference hydrofilních nanovláknenných materiálů, které nedostatečně adherují k ráně
- Smáčivost nanovláknenných materiálů je obtížně měřitelná veličina

25

3. J. G. Merrel, S. W. McLaughlin, L. Tie, C. T. Laurencin, A. F. Chen, L. S. Nair, Curcumin loaded poly(ε-caprolacton) nanofibres: Diabetic wound dressing with antioxidant and anti-inflammatory properties, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 36(12) (2009) 1149 – 1156.

V rámci této studie se autoři zaměřili na funkcionalizaci PCL scaffoldu pomocí kurkuminu, fenolické sloučeniny, o které je známo, že má antioxidační a protizánětlivé účinky. Působí také proti vzniku infekcí. To dělá z kurkuminu výborného adepta pro hojení ran. Tato molekula má však velmi nízkou in vivo stabilitu. Proto se autoři tohoto článku rozhodli použít PCL scaffold jako nosič této sloučeniny. Zároveň průměry vláken scaffoldu jsou podobné průměru vláken kolagenu a napodobují tak extracelulární matrix a napomáhají tak lepší adhezi a proliferaci buněk na scaffoldu. Výhodou také je, že k uvolňování kurkuminu dochází pozvolna během několika dní, což zajišťuje trvalý a přísun této léčivé látky do rány během celého procesu hojení. Z jejich in vitro i in vivo experimentů vyplývá, že scaffold obohacený kurkuminem výrazně lépe napomáhá hojení rány oproti kontrolnímu PCL scaffoldu bez kurkuminu. Tato studie naznačuje další možný budoucí vývoj scaffoldů směrem ke zlepšení jejich už i tak výjimečných schopností hojit rány.

15 Nevýhody:

- Nutnost izolace jakýchkoliv bioaktivních molekul často náročná na čas i instrumentaci
- Izolované sloučeniny často nestabilní, případně ztrácí aktivitu po inkorporaci do scaffoldu
- Problém s řízeným postupným uvolňováním

4. G. Jin, M. P. Prabhakaran, D. Kai, S. K. Annamalai, K. D. Arunachalam, S. Ramakrishna, Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing, Biomaterials 34 (2013) 724 – 734.

25 Autoři tohoto článku navazují na mnohaleté poznatky medicíny, kdy se využívají různé léčivé byliny a jejich extrakty nejen k léčbě různých onemocnění, ale také k hojení například popálenin a jiných kožních ran. V této studii si k testování vybrali rostliny *Indigofera aspalathoides* (PCL/IA), *Azadirachta indica* (PCL/AI), *Memecylon edule* (PCL/ME) a *Myristica andamanica* (PCL/MA). Jako scaffold si

zvolili nanovlákná PCL vyrobená elektrostatickým zvlákňováním. Z jejich studie vyplývá, že všechny použité scaffoldy jsou cytokompatibilní, netoxické a podporují proliferaci buněk. Všechny vyrobené scaffoldy vykazují lepší vlastnosti než samotné PCL, nejlepší výsledky však celkově vykazoval materiál PCL/ME. Toto je
 5 další studie poukazující na to, že budoucnost krytů ran bude ve funkcionalizaci nanovláknenných scaffoldů, což ještě podpoří jejich již tak vynikající mechanické vlastnosti, díky kterým se již v současné době výborně hodí pro využití jako krytů ran.

Nevýhody:

- 10 • Funkcionalizace PCL nanovláknenného scaffoldu není nezbytně nutná, scaffold nevyvolává zánětlivé reakce, bakteriální kontaminaci je zabráněno díky malým pórům nanovláknenné vrstvy
- Složitost systému, nanovláknenné PCL, samo o sobě vykazuje podporu hojení rány a navození regenerace poranění
- 15 • V případě potřeby je možné nanovláknenný PCL scaffold kombinovat s dalšími přípravky používanými pro podporu hojení ran

5. R. V. Madhavan, M. J. Rosemary, M. A. Nandkumar, K. V. Krishnan, L. K. Krishnan, Silver nanoparticle impregnated poly (ϵ -caprolacton) scaffolds:
 20 Optimization of antimicrobial and nontoxic concentrations, Tissue Engineering Part A 17 (2011), 439 – 449.

V této studii se autoři zaměřili na výrobu PCL scaffoldu s příměsí nanočástic stříbra. Stříbrné nanočástice mají vynikající antimikrobiální účinky proti širokému spektru mikroorganismů i při nízkých koncentracích například oproti antibiotikům,
 25 které často mají relativně úzkou specifitu. Navíc proti antibiotikům si mikroorganismy umí velice účinně získat rezistenci. Stříbrné nanočástice působí jak proti Gram pozitivním, tak Gram negativním bakteriím, virům a plísním. Navíc tyto částice vykazují i protizánětlivé účinky při hojení diabetických i chronických ran a popálenin. Je ovšem důležité nelézt optimální koncentraci, protože vysoké

koncentrace stříbra mohou být toxické pro pacientovu tkáň. Tento článek popisuje další možné modifikace tkáňových nosičů, tentokrát anorganickými sloučeninami, které především vykazují antimikrobiální aktivitu, zamezují vzniku infekce, čímž napomáhají efektivnějšímu hojení.

5 Nevýhody:

- Použití nanočástic stříbra, které mohou být toxické
- Zabrana kontaminace je zajištěna malými póry v nanovlákně, která zabrání průniku bakterií a jiných mikrobiálních agens

10 Degradace PCL:

6. Hongfan Sun, Lin Mei, Cunxian Song, Xiumin Cui, Pengyan Wang, The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant, Biomaterials 27 (2006) 1735–1740.

15

V této práci byla studována in vivo degradace poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL). Studie byla prováděna po dobu 3 let na laboratorních potkanech. Distribuce, vstřebávání a vylučování PCL byly sledovány pomocí radioaktivního značení PCL Tritiem. Výsledky ukázaly, že kapsle z PCL s počáteční molekulovou hmotností (MW) 66 000 si zachovala svoji formu během implantace po dobu 2 let. Během 30 měsíců došlo k snížení molekulové hmotnosti PCL na hodnotu (Mw 8000). Molekulová hmotnost PCL se snižovala s časem podle lineárního vztahu mezi $\log(Mw)$ a časem. Tritiem značené PCL (molekulová hmotnost 3000) ve formě podkožních implantátů u potkanů byly testovány na vstřebávání a vylučování.

20

25

Radioaktivní stopovací látky byly poprvé zjištěny v krevní plazmě potkanů 15 dnů po implantaci. Současně radioaktivní byly radioaktivně značené látky extrahovány z výkalů a moči. Celkem 92% implantovaného PCL a produktů jeho rozpadu bylo vyloučeno cestou výkalů a moči 135 dnů po implantaci. V té době radioaktivita plazmy klesla na úroveň pozadí. Radioaktivita v orgánech potkanů bylo blízko

hodnot úrovně pozadí. To potvrzuje, že materiál PCL a produkty jeho rozkladu se neakumulují v tělesné tkáni pokusných zvířat. Naopak jejich kumulace v tkáních byla pokusem zcela vyloučena.

5 Nevýhody:

- V článku byla zkoumána biodegradabilita PCL kapslí, nikoliv PCL vláken nebo nano-vláken.
- PCL materiál zde nebyl použit pro studium hojení kožních poranění.

- 10 7. N. Bolgen, Y.Z. Menciloglu, K. Acatay, I. Vargel, E. Piskin, In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions, J Biomater Sci Polymer Edn 16 (2005) 1537-1555.

15 Práce výše zmíněných autorů byla zaměřena na studium degradace nanovláknenné vrstvy z polykaprolaktonu v podmínkách in vitro a in vivo. Bylo zjištěno, že rychlost degradace závisí na průměru vláken, slabší vlákna degradují rychleji díky větší plošné hmotnosti. Degradace v podmínkách in vitro byla testována po dobu 6 měsíců. Degradace probíhala především mechanismem hydrolýzy. Po 6 měsících došlo ke snížení molekulové hmotnosti polykaprolaktonu a ke zhoršení

20 mechanických vlastností (pokles pevnosti v tahu, Youngova modulu a prodloužení). Pokusy v in vivo podmínkách byly prováděny na laboratorních potkanech subkutánní implantací po dobu 90 dnů. Doba degradace byla rychlejší v in vivo podmínkách díky enzymatické degradaci, která je mimo hydrolýzy dalším mechanismem degradace polykaprolaktonu.

25 Nevýhody:

Degradace PCL byla sledována po subkutánní implantaci, PCL pro kryty ran může degradovat odlišnou rychlostí díky přítomnosti jiných enzymů, jinému pH v místě rány apod.

Dále uvádíme jako stav techniky patent z oblasti „Nanovláknenné kryty ran“:

US 20130150763 A1

Electro spun nanofibrous wound dressing and a method of synthesizing the same

- 5 Tento patent popisuje 3 vrstvou nanovláknennou vrstvu používanou pro kryty ran. Vnější vrstva je hydrofilní a má podpůrnou funkci. Střední vrstva je tvořená ze zesíťovaného genipinu a obsahuje extrakt *Melilotus officinalis*. Vnitřní vrstva je tvořená nesíťovaným chitosanem. Do vrstev mohou být přidávána různá aditiva, která ovlivňují rychlost uvolňování bylinného extraktu.
- 10 Nevýhody:
- Hydrofilní vrstvy neumožňují dobrou adhezi k ráně
 - Síťování polymeru ve střední vrstvě musí být plně kontrolováno, uvolňování léčivých látek přesně řízeno

15 **Podstata vynálezu**

Cílem tohoto řešení by mělo být zajištění jednoduchého úložného útvaru z biokompatibilních polymerů především pro krytí kožních ran.

- Pomocí technologie elektrického zvlákňování, odstředivého zvlákňování, meltblownu a kombinací těchto technologií je možné vytvořit nanovláknenný
- 20 materiál, který vykazuje vlastnosti netkané textilie. Jedinečností tohoto materiálu je průměr vláken, tedy nano-vláknenného materiálu, který je použit pro vytvoření materiálu kožního krytu. Výhodou je struktura vyrobeného materiálu, kdy kožní kryt působí současně jako bariera proti působení bakterií a zároveň jako polopropustná membrána pro průnik kyslíku a odvod nežádoucích látek. V současnosti se
- 25 takovéto jednoduché membrány nevyužívají jako kožní kryty. Výhodou je zde patentovaný způsob výroby nanovláknenného krytu bez dodatečného přídavku léčiva, který je možno bez problému přidat ex post. Výhodou je využití

biokompatibilního a biodegradabilního polymerního materiálu pro krytí kožních defektů.

Další výhodou nanovláknenné vrstvy z polycaprolaktonu vyrobené podle tohoto vynálezu, je dosažení stejných vlastností vrstev nanovláken díky zachování molekulové hmotnosti použitého polymeru, což u biologických polymerů není možné. Tudíž při dodržení výrobních podmínek můžeme zaručit, že vyrobený materiál bude mít vždy stejné vlastnosti. Zároveň výroba nanovláknenného PCL pomocí elektrostatického zvlákňování je na průmyslové úrovni, tudíž je možné zajistit vysokou produkci kusů ran za přijatelnou cenu. Díky tomu, že scaffold není ničím funkcionalizovaný, je jej tudíž možné sterilizovat studeným etylenoxidem, aniž by to ovlivnilo jeho funkci. To je schválený proces sterilizace materiálů v medicíně. Vyrobený materiál je snadno aplikovatelný a má léčivé účinky především díky své primární struktuře. Svým uspořádáním napodobuje vlákna kolagenu v extracelulární matrix, což napomáhá adhezi a proliferaci pacientových buněk na scaffoldu a tím dochází k uzavírání rány. Zároveň díky své vysoké porositě umožňuje difundaci plynů mezi ránou a okolím, přísunu kyslíku, což opět příznivě ovlivňuje vývoj hojení rány. Díky vysoké porositě navíc dochází k odtoku přebytečných tekutin z rány. Tyto póry scaffoldu jsou ovšem natolik malé, že zamezují průniku bakterií. To znamená, že námi vyrobený scaffold působí zároveň jako antibakteriální bariéra. Velkou výhodou je, že jej lze kombinovat s dalšími běžně dostupnými léčivy na podporu hojení rány, jako jsou lokální antibiotika, antiseptika a podobné. Není tudíž nutné takovýto scaffold dále upravovat a funkcionalizovat.

Aplikace je rovněž nová v tom, že takový materiál na trhu není a veškeré rešerše, které byly provedeny hovoří jenom o materiálech z nanovláken, které navíc byly dotovány biologicky aktivní látkou (např. s bakterocidním účinkem)

Zařízení pro výrobu plošného vláknenného útvaru obsahujícího polymerní nanovlákna podle tohoto vynálezu sestává z dopravníkového pásu na němž je umístěna netkaná textilie sloužící jako nosič vláknenného útvaru podle tohoto

vynálezu, který je vytvářen dvěma zdroji - zvlákňující elektrodou napájenou střídavým napětím a metodou odstředivého zvlánování, kdy je tímto postupem vytvořena na povrchu netkané textilie vrstva z biodegradabilních a biokompatibilních polymerů podle tohoto vynálezu.

- 5 Tento typ krytu kožních defektů má následující výhody: V mezidobí léčení defektu, kdy nejsou k dispozici definitivní výsledky, je často pod standardním dočasným krytím nastartován proces hojení, který je následně narušen při jeho snímání před plánovaným definitivním řešením rány některou z plastických technik. Pro pacienty tento postup znamená stresovou zátěž a proces hojení začíná opět od začátku.
- 10 Přiložení nanovláknenných scaffoldů, vyrobených podle tohoto způsobu, po primární excizi bez uzávěru rány se v těchto případech jeví jako šetrnější a příznivější.

- Nanovláknenná PCL struktura vyrobená elektrospinningem je velice podobná pars reticularis koria (lat. hlubší vrstva škáry), a proto je ideální k využití jako základny pro reparaci a regeneraci tkání. Další výhodou je, že nanovláknena jsou extrémně
- 15 tenká. V důsledku toho jsou velmi flexibilní (tj. vykazují extrémně nízké hodnoty ohybového modulu). V důsledku toho tenké vrstvy z nich vyrobené snadno přilnou ke spodině rány.

- PCL nanovláknenné vrstvy vyrobené podle tohoto způsobu mají vysokou pórovitost a svou přístupností pro vzdušný kyslík usnadňují a urychlují hojení ran. Velkým
- 20 pozitivem je také to, že tyto nanovláknenné struktury znesnadňují průchod buněk o velikosti bakterií, a tím působí jako antibakteriální bariéra.

Přehled obrázků na výkrese

- 25 Obr. 1 : Vlákenný materiál vyrobený technologií elektrostatického zvlákňování z polykaprolaktonu připravovaného v příkladu 1 ve dvou zvětšeních dle měřítka v liště snímku snímané mikroskopem Phenom FEI.

Obr. 2: Vlákenný materiál vyrobený technologií elektrostatického zvlákňování z polykaprolaktonu připravovaného v příkladu 2 ve dvou zvětšeních dle měřítka v liště snímku snímané mikroskopem Tescan Vega.

Obr. 3: Vlákenný materiál vyrobený technologií odstředivého zvlákňování z roztoku polykaprolaktonu připravovaného v příkladu 3 ve dvou zvětšeních dle měřítka
5 v liště snímku snímané mikroskopem Tescan Vega.

Obr. 4: Vlákenný materiál vyrobený technologií odstředivého zvlákňování z taveniny polykaprolaktonu připravovaného v příkladu 4 ve dvou zvětšeních dle měřítka v liště snímku snímané mikroskopem Tescan Vega.

10 Obr. 5: Vlákenný materiál vyrobený kombinací technologií meltblown a elektrostatické zvlákňování z polykaprolaktonu připravovaného v příkladu 5 ve dvou zvětšeních dle měřítka v liště snímku snímané mikroskopem Tescan Vega.

Obr. 6: Schéma zařízení pro výrobu plošného vlákenného útvaru obsahujícího polymerní nanovlákná.

15 Snímky vlákenných materiálů byly provedeny na mikroskopu Tescan Vega 3SB Easy Probe a Phenom FEI. Urychlovací napětí použité na mikroskopu Phenom FEI bylo 5kV, tlak v komoře: vysoké vakuum, zobrazovací režim: sekundární elektrony. Urychlovací napětí použité na mikroskopu Tescan Vega 3SB Easy Probe bylo 20 kV a 30 kV, tlak v komoře: vysoké vacuum, zobrazovací režim: sekundární
20 elektrony, pracovní vzdálenost: WD od 13 do 18 mm.

Vlákenná vrstva byla nalepena uhlíkovou oboustranně lepící páskou na kovový terčík a následně naprášena zlatem. Vrstva zlata navzorku: cca 7nm, naprašující stroj: Q150R (Quorum Technologies, UK).

K měření průměrů vláken ze snímků vytvořených pomocí rastrovacích
25 elektronových mikroskopů byl využit software NIS ELEMENTS (LIM s.r.o., Česká Republika).

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1. Příprava vrstev z polykaprolaktonu pomocí elektrostatického zvlákňování

Polykaprolaton (Poly- ϵ -caprolactone (PCL; Mw 45,000; Sigma Aldrich) byl rozpuštěn ve směsi chloroform (Penta)/ etanol (Penta) v hmotnostním poměru 9:1.

- 5 Polymeru v roztoku bylo 16hm%. Takto připravený roztok byl umístěn na 12 hodin na magnetické míchadlo za laboratorních podmínek. Dále byl roztok elektrostaticky zvlákněn na zařízení Nanospider NS 4S1000U (Elmarco, Česká republika) a to se strunou jako zvlákňovací elektrodou. Zvlákňovací elektroda byla na +30kV, kolektor, pod nímž prochází podkladová textilie (spunbond), byl nabíjen na -10kV.
- 10 Odtahová rychlost podkladové textilie byla v tomto příkladu 15mm/min. Výsledná elektrostaticky zvlákněná vrstva měla plošnou hmotnost 3g/m². Průměry vláken se pohybují u nanovláken okolo střední hodnoty 239±94 nm, zatímco mikrovlákná mají střední hodnotu 3664±731 nm.

- 15 Příklad 2: Příprava vrstev z polykaprolaktonu pomocí elektrostatického zvlákňování
- Polykaprolaton (Poly- ϵ -caprolactone (PCL; Mw 45,000; Sigma Aldrich) byl rozpuštěn ve směsi chloroform (Penta)/ etanol (Penta)/ kyselina octová (Penta) v hmotnostním poměru 8:1:1. Polymeru v roztoku bylo 16hm%. Takto připravený roztok byl umístěn na 12 hodin na magnetické míchadlo za laboratorních
- 20 podmínek. Dále byl roztok elektrostaticky zvlákněn na zařízení Nanospider NS 4S1000U (Elmarco, Česká republika) a to se strunovým válečkem jako zvlákňovací elektrodou. Zvlákňovací elektroda byla na +30kV, kolektor, pod nímž prochází podkladová textilie (spunbond), byl nabíjen na -10kV. Odtahová rychlost podkladové textilie byla v tomto příkladu 15mm/min. Výsledná elektrostaticky
- 25 zvlákněná vrstva měla plošnou hmotnost 4,6 g/m². Průměry vláken se pohybují u nanovláken okolo střední hodnoty 239±94 nm, zastoupení mikrovláken bylo 5,3%.

Příklad 3. Příprava vrstvy z polykaprolaktonu pomocí odstředivého zvlákňování z roztoku

- Polykaprolaton (Poly- ϵ -caprolactone (PCL; Mw 80,000; Sigma Aldrich) byl rozpuštěn ve směsi chloroform (Penta)/ etanol (Penta) v hmotnostním poměru 9:1.
- 5 Polymeru v roztoku bylo 12hm%. Takto připravený roztok byl umístěn na 12 hodin na magnetické míchadlo za laboratorních podmínek. Dále byl roztok odstředivě zvlákňován pomocí zařízení Fiber Engine 1.1 (FibeRio Technology Corporation, USA). Otáčky zvlákňovacích spinneret byly 11000 otáček za minutu. Výsledná plošná hmotnost vrstvy byla 2,8g/m². Střední hodnota průměrů vláken byla
- 10 942±347nm, zastoupení mikrovláken bylo 38%.

Příklad 4. Příprava vrstvy z polykaprolaktonu pomocí odstředivého zvlákňování z taveniny

- Polykaprolaton (Poly- ϵ -caprolactone (PCL; Mw 45,000; Sigma Aldrich) byl
- 15 odstředivě zvlákňován pomocí průmyslového zařízení na výrobu cukrové vaty s otáčkami zvlákňovací jednotky 3500 otáček za minutu a teplotou 90°C. Vrstva byla zachytávána na sérii tyčových kolektorů s výškou 25 cm umístěné ve vzdálenosti 50 cm od středu zvlákňovací jednotky. Výsledná plošná hmotnost vrstvy byla 7 g/m². Střední hodnota průměrů vláken byla 1552±847m, zastoupení
- 20 mikrovláken bylo 49%.

Příklad 5. Příprava vrstvy z polykaprolaktonu pomocí kombinace technologií meltblown a elektrostatické zvlákňování

- Poly- ϵ -caprolactone (PCL; Mw 45,000; Sigma Aldrich), chloroform (Penta), etanol
- 25 (Et-OH; Penta) byly použity pro výrobu vlákenných materiálů. Roztok 16hm% PCL ve směsi chloroform/etanol (9:1 hmotnostně) byl připraven pro elektrostatické zvlákňování. Zařízení na výrobu jsou laboratorní zařízení meltblown (laboratory equipment J&M Laboratories, USA) a zařízení na elektrostatické bezjehlové

zvlákňování s využitím strunového válečku rotujícího ve vaničce s polymerním roztokem (princip technologie Nanospider™) jako zvlákňovací elektrody. Šroub extrudéru meltblowu rotoval 40 otáček za minutu, což znamená 100g polymeru za hodinu. Rychlost vzduchu ve vzdálenosti 20 cm od zvlákňovací trysky byla 20 ms^{-1} .

- 5 Délka zvlákňovací trysky byla 15 cm. Otáčení zvlákňovací elektrody u elektrostatického zvlákňování bylo 50 otáček za minutu s průměrem válečku 30 mm a délkou 15 cm. Váleček byl nabíjen zdrojem vysokého napětí na +35kV a kolektor byl nabíjen na -20kV. Okolní teplota a vlhkost byly 23°C; 45%RH. Finální plošná hmotnost vyrobeného materiálu byla 15 g/m^2 , střední hodnota průměru
- 10 elektrostaticky zvlákněných vláken byla $732 \pm 292 \text{ nm}$, střední hodnota vláken vyrobených technologií meltblown byla $6,5 \pm 4,4 \mu\text{m}$. Zastoupení nanovláken (vláken s průměrem pod $1 \mu\text{m}$) bylo objemově 1%, početně pak 56% v celém materiálu.

- Zařízení pro výrobu plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran sestává z nejméně dvou zdrojů pro
- 15 generování nanovláken, a to ze zvlákňovací elektrody 1 napájené střídavým napětím a zařízením 4 pro tvorbu nanovláken 3 a 5 metodou odstředivého zvlákňování, kdy je vytvořena vrstva 7 z nanovláken 3 a 5 na povrchu nosné netkané textilie 6 která je unášena dopravníkovým pásem 1.

20 Průmyslová využitelnost

- Obvazový materiál (kryt ran) z polykaprolaktonových (PCL) nanovláken otvírá celou řadu nových možností v souvislosti s rychlým vývojem věd o nanomateriálech a nanotechnologie. Jednou z aplikací je výroba krytů kožních ran v podobě tenké nanovláknenné netkané textilie, která svými vlastnostmi podporuje
- 25 epitelizaci a hojení rány.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu, **vyznačující se tím, že** je vyroben biokompatibilního nebo biodegradabilního polymeru, kyseliny polyglykolové (PGA), kyseliny polymléčné (PLA, PLLA, PLDA), polyvinylalkoholu (PVA), kolagenu, chitosanu, fibroinu a včetně jejich kopolymerů a směsí metodami elektrického zvlákňování, odstředivého zvlákňování, meltblownu a kombinací těchto technologií, ze všech těchto materiálů : polykaprolakton (PCL), přičemž výsledný materiál je sterilizovaný etylenoxidem.

2. Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu podle bodu 1, **vyznačující se tím, že**, tenká nanovláčenná vrstva se ukládá na povrch nosné textilie metodou stejnosměrného zvlákňování z polymerního roztoku nebo z taveniny.

3. Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu podle předchozích bodů, **vyznačující se tím, že**, tenká nanovláčenná vrstva se ukládá na povrch nosné textilie metodou meltblown.

4. Způsob výroby plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran, a zařízení k provádění tohoto způsobu, **vyznačující se tím, že** zařízení pro výrobu plošného útvaru z biodegradabilních a biokompatibilních nanovláken, především pro kryt kožních ran sestává z nejméně dvou zdrojů pro generování nanovláken, a to ze zvlákňovací elektrody (2) napájené střídavým napětím a zařízením (4) pro tvorbu nanovláken metodou odstředivého zvlákňování kdy je vytvořena vrstva (7)

20.02.15

Stránka ~~17~~ z 21

— 17 —

z nanovláken (3) a (5) na povrchu nosné netkané textilie (6) která je unášena
dopravníkovým pásem (1)

20.02.15

Stránka 18 z 21

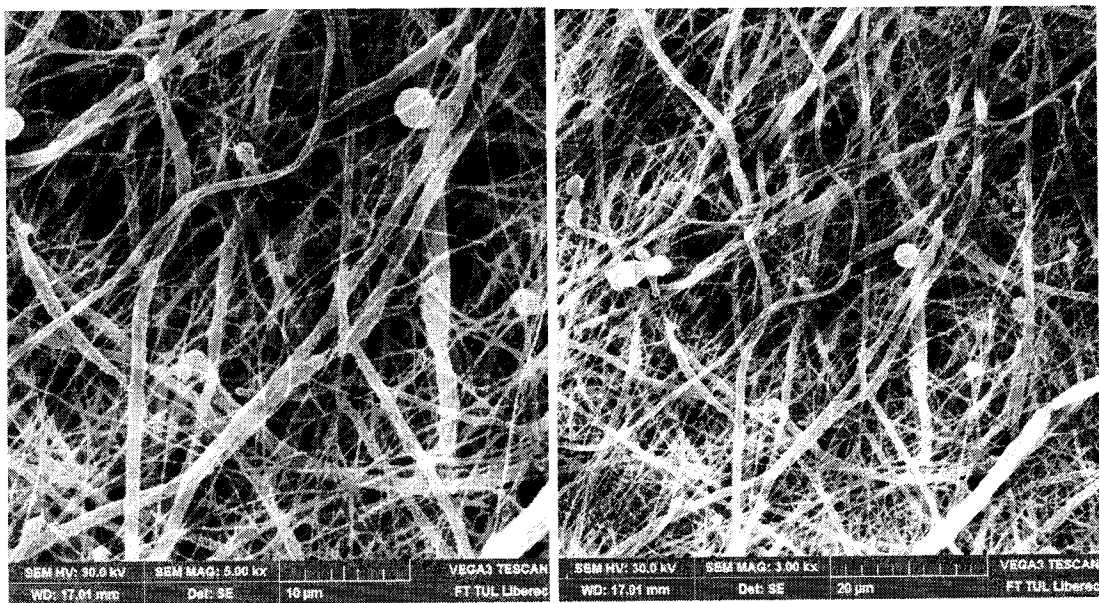
2015-122

713

Obr. 1



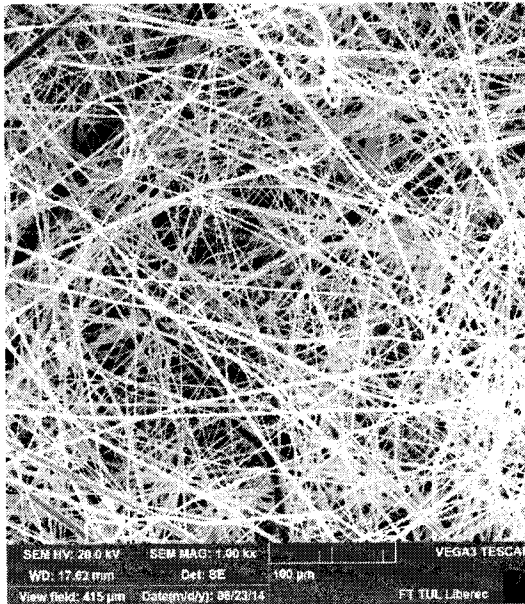
Obr. 2



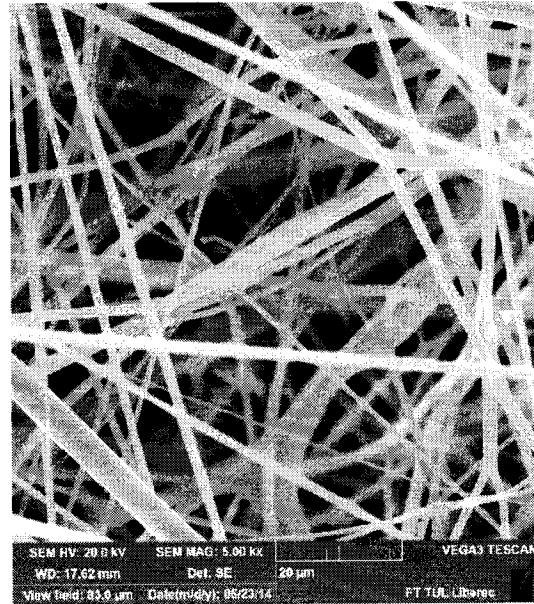
217

Obr. 3

5



10



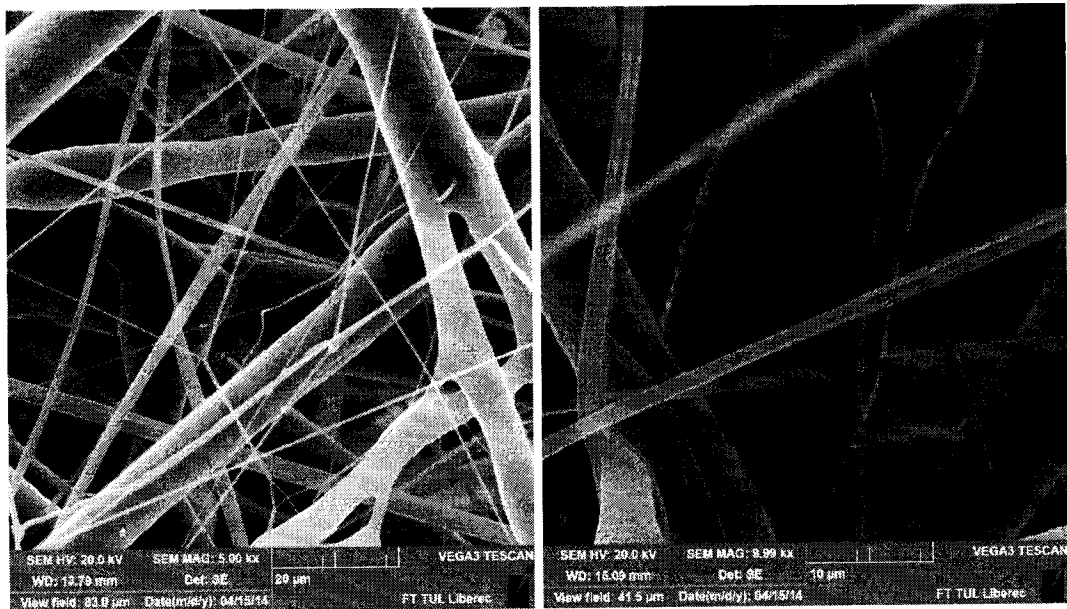
Obr. 4



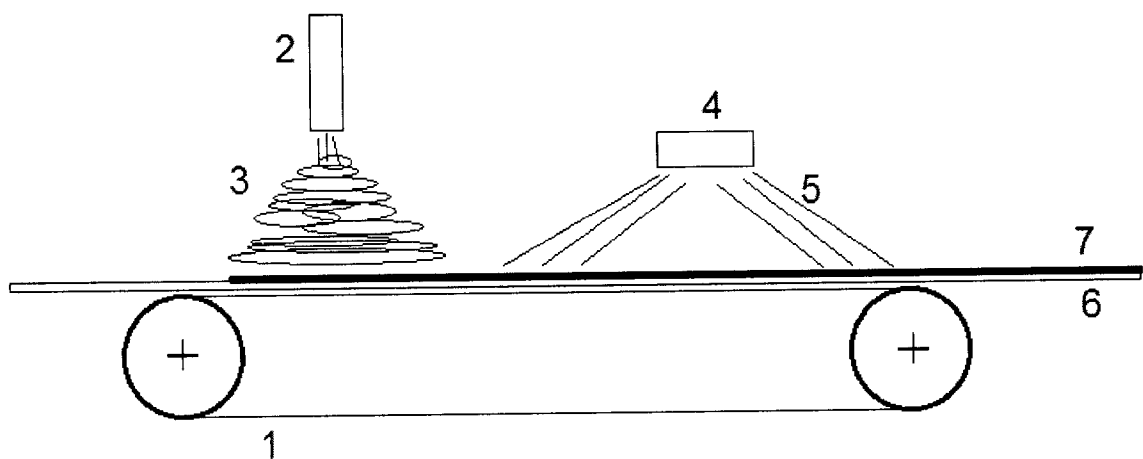
15



Obr. 5



5 Obr. 6:



Příloha č. 8

Patent: Cévní náhrada, zejména maloprůměrová cévní náhrada

PATENTOVÝ SPIS

306 213

(51) Int. Cl.:

(21) Číslo přihlášky:	2015-159
(22) Přihlášeno:	06.03.2015
(40) Zveřejněno:	05.10.2016
(Věstník č. 40/2016)	
(47) Uděleno:	24.08.2016
(24) Oznámení o udělení ve věstníku:	05.10.2016
(Věstník č. 40/2016)	

<i>A61F 2/06</i>	(2013.01)
<i>A61L 27/26</i>	(2006.01)
<i>A61L 27/38</i>	(2006.01)
<i>A61L 27/54</i>	(2006.01)
<i>A61L 27/58</i>	(2006.01)
<i>B82Y 5/00</i>	(2011.01)

(57) Anotace:
Vynález se týká cévní náhrady, zejména maloprůměrové cévní náhrady, která obsahuje vnitřní vrstvu tvořenou nanovláknny a/nebo mikrovláknny a vnější vrstvu tvořenou nanovláknny a/nebo mikrovláknny, přičemž obě tyto vrstvy jsou tvořeny nanovláknny a/nebo mikrovláknny z kopolymeru kyseliny polymléčné (PLA) a polykaprolaktonu (PCL), s poměrem PLA a PCL 9:1 až 1:9.

CZ 306213 B6

Cévní náhrada, zejména maloprůměrová cévní náhrada

Oblast techniky

5

Vynález se týká cévní náhrady, zejména maloprůměrové cévní náhrady.

Dosavadní stav techniky

10

V současné době se jako cévní náhrady používají hadičky vytvořené z inertních materiálů, jako např. polytetrafluorethylenu (ePTFE), polyesteru (PES, Dacron®) nebo polyuretanu (PUR). Jak se postupně ukazuje v praxi, jsou tyto náhrady dobře použitelné pro náhradu cév s vnitřním průměrem nad 6 mm, ve kterých je dostatečný průtok krve, avšak zcela nevhodné pro náhradu cév s menším vnitřním průměrem, neboť u nich, díky inertnosti a hydrofobicitě použitého materiálu a nízkému průtoku krve, snadno dochází ke vzniku krevních sraženin (trombotizaci), prorůstání hladkosvalových buněk z vnějšku do vnitřního prostoru cévy (intimální hyperplasii) nebo naopak vytváření výdutí (aneurysma).

20

Tyto nedostatky jsou do jisté míry odstraněny cévními náhradami vytvořenými z biodegradabilních materiálů, jako např. poly-ε-kaprolaktonu (PCL) nebo kyseliny poly-L-mlečné (PLLA), apod., které na počátku slouží jako podpora pro zachycení a růst buněk příjemce, přičemž svým postupným rozkladem umožňují těmto buňkám tzv. remodelaci tkáně, resp. postupné vytvoření nové cévy s její přirozenou strukturou a díky tomu i přirozenými vlastnostmi. Při implantaci těchto cévních náhrad u potkanů došlo zcela k odstranění trombotizace, a ke značnému omezení hyperplasie.

Nevýhodou těchto materiálů jsou však jejich nedostatečné mechanické vlastnosti způsobené značným podílem krystalické fáze. Navíc degradační produkty PLLA snižují fyziologické pH v okolí náhrady, čímž mohou způsobovat zánět. Společnou nevýhodou PLLA, PCL, ale i jiných polymerů je pak neměnná délka jejich degradace, přičemž PLLA se rozpadá v podstatě najednou, a PCL se naopak rozpadá velmi neochotně.

Cílem vynálezu je navrhnout cévní náhradu, zejména maloprůměrovou cévní náhradu, kterou by bylo možné použít okamžitě, bez nutnosti předchozího osazení endotelovými buňkami, a jejíž materiál by umožňoval řídit, resp. předem nastavit dobu rozpadu této náhrady v těle příjemce.

Podstata vynálezu

40

Cíle vynálezu se dosáhne cévní náhradou, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje vnitřní vrstvu tvořenou nanovláknem a/nebo mikrovláknem pro zachycení a růst endotelových buněk, a vnější vrstvu tvořenou nanovláknem a/nebo mikrovláknem pro zachycení a růst hladkosvalových buněk, přičemž obě tyto vrstvy jsou tvořeny nanovláknem a/nebo mikrovláknem z kopolymeru kyseliny polymlečné (PLA) a polykaprolaktonu (PCL), s poměrem PLA a PCL dle požadavků 9:1 až 1:9. Tento kopolymer má podstatně lepší mechanicko-elastické vlastnosti než kterýkoliv biologicky degradovatelný polymer a současně umožňuje poměrem PLA a PCL dosáhnout požadované délky rozpadu cévní náhrady.

50

Pro usnadnění adheze endotelových buněk je na vnitřním povrchu cévní náhrady s výhodou navázán alespoň jeden adhezni protein, jako např. fibronectin, apod.

V kterékoliv z vrstev cévní náhrady podle vynálezu může být zakomponována alespoň jedna aktivní látka podporující růst endotelových buněk a/nebo omezující růst hladkosvalových buněk a/nebo potlačující srážení krve a/nebo potlačující či tlumící zánět. Tato látka je přitom uložena v

materiálu nanovláken a/nebo mikrovláken vnější vrstvy a/nebo vnitřní vrstvy cévní náhrady, a/nebo je uložena v kapslích z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru, které jsou uloženy mezi nanovláknem a/nebo mikrovláknem vnější vrstvy a/nebo vnitřní vrstvy cévní náhrady.

5

Výhodnou aktivní látkou je přitom například vhodný donor oxidu dusnatého (NO), jako např. S-nitrosothiol nebo N-diazenium diolát, apod.

10

Pro usnadnění zachycení a růstu hladkosvalových buněk na vnější vrstvě cévní náhrady je výhodné, pokud jsou vlákna této vrstvy uspořádána po obvodu cévní náhrady přednostně kolmo nebo v podstatě kolmo k její podélné ose.

15

Ve výhodné variantě provedení cévní náhrady podle vynálezu má její vnitřní vrstva tloušťku 5 až 50 mikrometrů, a její vnější vrstva tloušťku 100 až 300 mikrometrů.

Objasnění výkresů

20

Na přiložených výkresech je na obr. 1 schematicky znázorněno zařízení pro výrobu cévní náhrady podle vynálezu v první příkladné variantě provedení, na obr. 2 zařízení pro výrobu cévní náhrady podle vynálezu ve druhé příkladné variantě provedení, na obr. 3a SEM snímek vnitřní vrstvy cévní náhrady podle vynálezu při zvětšení 993x, na obr. 3b SEM snímek vnější vrstvy cévní náhrady podle vynálezu při zvětšení 1000x, na obr. 4a až 4c SEM snímky průřezů cévních náhrad podle vynálezu s různými vnitřními průměry při zvětšení 100x, a na obr. 5 křivky měření mechanického napětí cévních náhrad podle vynálezu s vnitřním průměrem 4 mm, na obr. 6a SEM snímek cévní náhrady vytvořené z PCL osazené in-vitro endotelovými buňkami, na obr. 6b SEM snímek cévní náhrady podle vynálezu osazené in-vitro endotelovými buňkami, na obr. 7a snímek cévní náhrady vytvořené z PCL osazené in-vitro endotelovými buňkami dle obr. 6a z fluorescenčního mikroskopu, a na obr. 7b snímek cévní náhrady podle vynálezu osazené in-vitro endotelovými buňkami dle obr. 6b z fluorescenčního mikroskopu.

30

Příklady uskutečnění vynálezu

35

Cévní náhrada podle vynálezu je vytvořena jako dvou- (viz např. obr. 4a až 4c) případně vícevrstvá cévní náhrada, jejíž vrstva umožňuje přirozenou infiltraci a růst hladkosvalových buněk, a jejíž vnitřní vrstva s menší porózitou a menší tloušťkou (řádově jednotky mikrometrů) než vnější vrstva umožňuje přirozenou infiltraci a růst endotelových buněk - viz např. obr. 3a, na kterém je SEM snímek vnitřní vrstvy cévní náhrady tvořené nanovláknem, a obr. 3b, na kterém je SEM snímek vnější vrstvy cévní náhrady tvořené nanovláknem. Všechny tyto vrstvy jsou přitom tvořeny vlákny (zejména nanovláknem, směsí nanovláken a mikrovláken, nebo mikrovláknem) z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného materiálu - kopolymeru vytvořeného kopolymerací kyseliny polymléčné (PLA) a polykaprolaktonu (PCL) ve vzájemném poměru 9:1 až 1:9. Tento kopolymer má přitom ve srovnání se samotným PCL nebo PLA vynikající mechanicko-elastické vlastnosti (např. při poměru PLA a PCL 7:3 bylo průměrné napětí v okamžiku nevratné deformace 9,34 MPa a průměrné elastické natažení 618 %, což je zhruba 4x více než pro samotný PCL), přičemž si však zachovává svoji biologickou degradovatelnost. Tu lze navíc řídit poměrem PLA a PCL v kopolymeru (PLA degraduje rychleji než PCL) a morfologií jednotlivých vrstev cévní náhrady. Současně se během in-vitro testování překvapivě ukázalo, že vrstva tvořená nanovláknem z tohoto kopolymeru se lépe a rychleji infiltruje a osídluje endotelovými buňkami než obdobná vrstva vytvořená z PCL nebo PLA (viz např. obr. 6a až 7b), takže je možné cévní náhradu vytvořenou z tohoto materiálu využít v klinické praxi i bez předchozího osazení endotelovými nebo jinými buňkami.

50

Na obr. 5 je pak graf odezvy na protahování tří stejných vzorků cévní náhrady o vnitřním průměru 4 mm a délce 5 cm podle vynálezu až do přetržení. Tyto vzorky byly uchyceny do trhačích stroje a zatěžovány rychlostí 300 mm/min, přičemž se sledovala silová odezva na zatěžování.

5 Ve výhodné variantě provedení cévní náhrady podle vynálezu, jsou pak všechny její vrstvy tvořeny výhradně nanovláknem, neboť vnitřní struktura nanovláknenných vrstev vytvořených některým ze známých způsobů vytváření nanovláken, je velmi podobná přirozené extracelulární hmotě, což infiltraci a osidlování endotelovými buňkami dále napomáhá. Mezi vnější vrstvou a vnitřní vrstvou přitom může být uložena alespoň jedna oddělovací vrstva vytvořená z nanovláken a/nebo
10 mikrovláken ze stejného kopolymeru.

V další výhodné variantě je tloušťka vnitřní vrstvy cévní náhrady řádově desítky mikrometrů (s výhodou cca 5 až 50 mikrometrů) a tloušťka vnější vrstvy cévní náhrady řádově stovky mikrometrů (s výhodou 100 až 300 mikrometrů), přičemž vnitřní vrstva obsahuje pouze nanovláknem o průměru do 1 mikronu, a vnější vrstva obsahuje vlákna o průměru kolem 1 mikronu, s výhodou cca 0,8 až 1,5 mikronu, případně i více, tj. je tvořena nanovláknem, nebo směsí nanovláken a mikrovláken, případně pouze mikrovláknem.

Všechny vrstvy cévní náhrady mohou být vytvořeny ze stejného kopolymeru PLA a PCL, nebo z odlišné varianty tohoto kopolymeru s odlišným poměrem PLA a PCL.

Kterákoliv z vrstev cévní náhrady podle vynálezu může v případě potřeby obsahovat alespoň jednu aktivní látku, která podporuje růst endotelových buněk (např. endotelový růstový faktor VEGF (= vascular endothelial growth factor), RGD nebo REDV sekvence apod.) a/nebo omezuje
25 růst hladkosvalových buněk a/nebo potlačuje srážení krve (například heparin) a/nebo potlačuje či utlumí zánětlivou reakci (například látky uvolňující oxid dusnatý), apod. Tato aktivní látka/látky přitom může být uložena přímo v materiálu vláken dané vrstvy (když tvoří např. část průměru a/nebo délky vláken, nebo jsou v materiálu vláken zachyceny její molekuly, shluky molekul, nanočástice nebo mikročástice), nebo může být uložena v kapslích z biologicky degradovatelného
30 polymeru, např. polyvinylalkoholu (PVA), polyvinylpyrolidonu (PVP), polyethylenoxidu (PEO), kopolymeru polymléčné a polyglykolové kyseliny (PLGA), apod., které jsou uloženy mezi vlákna dané vrstvy cévní náhrady, v případě RGD a REDV sekvencí pak může být vázána přímo na povrchu vláken. Ve všech variantách provedení se přitom tato aktivní látka/látky uvolňuje z biologicky degradovatelného polymeru vláken a/nebo kapslí dlouhodobě (po dobu až několik
35 měsíců) a do jisté míry (např. volbou polymeru a/nebo jeho síťováním/nesíťováním, apod.) také řízené. Vhodnou aktivní látkou jsou např. donory oxidu dusnatého (NO), jako např. S-nitrosothioly nebo N-diazonium dioláty, apod., neboť oxid dusnatý působí protektivně na kardiovaskulární systém tím, že tlumí aktivaci a agregaci krevních destiček, čímž zamezuje vzniku trombu, podporuje endotelizaci, tlumí proliferaci hladkosvalových buněk, čímž zamezuje vzniku
40 intimální hyperplazie a současně tlumí zánětlivou reakci, která v těle příjemce nastává vždy po implantaci cizorodého materiálu.

Kromě toho může být vnitřní povrch cévní náhrady opatřen různými adhezními proteiny, např. fibronectinem, apod., které podporují adhezi endotelových buněk. Tyto proteiny se přitom vážají k
45 povrchu vláken nevazebnými reakcemi.

Na obr. 6a až 7b je pak srovnán výsledek testu endotelizace nanovláknenné vrstvy z PCL a odpovídající nanovláknenné vrstvy z kopolymeru PLA a PCL. Obě vrstvy přitom byly osázeny endotelovými buňkami (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Lonza) a kultivovány v podmínkách
50 in vitro po dobu jednoho týdne. Po uplynutí této doby se buňky v dané vrstvě zafixovaly a zhodnotily se elektronovou mikroskopií (TESCAN) – viz obr. 6a (pro nanovláknennou vrstvu z PCL) a obr. 6b (pro nanovláknennou vrstvu z kopolymeru PLA a PCL) a fluorescenční mikroskopií po obarvení propidium jodidem – viz obr. 7a (pro nanovláknennou vrstvu z PCL) a obr. 7b (pro nanovláknennou vrstvu z kopolymeru PLA a PCL). Ze snímků jasně vyplývá, že endotelizace nanovláknenné vrstvy z kopolymeru PLA a PCL je podstatně úspěšnější.

Cévní náhrada podle vynálezu může mít libovolný vnitřní průměr, dle požadavků, s výhodou se však jedná o maloprůměrovou cévní náhradu s vnitřním průměrem pod 6 mm určenou např. pro bypass.

Výhodný způsob výroby cévní náhrady podle vynálezu bude dále popsán přihlédnutím k obr. 1 a 2, na kterých jsou schematicky znázorněny dvě příkladné varianty zařízení pro výrobu těchto cévních náhrad. Ve variantě znázorněné na obr. 1 obsahuje toto zařízení zvlákňovací elektrodu 1, která obsahuje zvlákňovací prvek tvořený kapilárou 10, a která je uložena pohyblivě vratně (šipky A a B) po horizontální dráze, přičemž je propojená s neznázorněným zásobníkem kopolymeru PLA a PCL, a s neznázorněným zdrojem vysokého stejnosměrného napětí nebo střídavého napětí. Proti ústí kapiláry 10 je pak ve vzdálenosti 10 až 30 cm, rovnoběžně s její dráhou, uspořádán kolektor 2 pro ukládání jednotlivých vrstev cévní náhrady podle vynálezu, který je spřažen s neznázorněným pohonem pro rotaci kolem své podélné osy 20. Tento kolektor 2 je s výhodou válcový, vyrobený z materiálu, ke kterému mají vytvářená vlákna 3 nízkou adhezi, např. nerezové oceli, teflonu či uhlíkového kompozitu, apod., nebo z jiného materiálu s takovou povrchovou vrstvou nebo úpravou. Průměr kolektoru 2 je přitom dán požadovaným vnitřním průměrem cévní náhrady. V případě, kdy je vytvořen z elektricky vodivého materiálu, může být současně propojen s opačným pólem zdroje vysokého stejnosměrného napětí než kapilára 10 nebo v ní uložený, resp. vedený roztok kopolymeru, nebo uzemněn, čímž se mezi ním a kapilárou 10, nebo na jejím povrchu uloženým roztokem kopolymeru vytvoří elektrostatické pole pro zvlákňování. Toto elektrostatické pole pak svým silovým působením vydluhuje z roztoku kopolymeru na hrotu kapiláry 10 jednotlivá vlákna 3 (dle nastavení nanovlákna a/nebo mikrovlákna), která jsou pak tímto polem unášena směrem ke kolektoru 2, na kterém se zachytávají a ukládají. Při rychlosti otáčení kolektoru 2 vyšší než 5000 otáček/min se tato vlákna 3 současně orientují po jeho obvodu kolmo nebo v podstatě kolmo k jeho podélné ose 20, resp. k podélné ose vytvářené cévní náhrady.

V neznázorněné variantě provedení lze pro výrobu vláken 3 využít více kapilár 10, které se pohybují podél alespoň části délky kolektoru 2, nebo jsou statické (pokud jsou upřádány po celé jeho délce, nebo po požadované části jeho délky). V jiné neznázorněné variantě provedení lze však použít i jiný typ zvlákňovací elektrody 1, např. alespoň jednu zvlákňovací elektrodu 1 tvořenou jehlou, tryskou, nebo skupinou jehel, trubiček nebo trysek, lištou, strunou, apod. nebo pohyblivou zvlákňovací elektrodu 1 tvořenou např. rotujícím podlouhlým tělesem dle CZ 294274, rotujícím diskem, spirálou, prstencem, atd., ve směru své délky se pohybující strunou dle CZ 300345, po kruhové dráze se pohybujícími strunami dle CZ 299549, převíjeným pásem dle CZ 2008-529, atd., přičemž se roztok pro zvlákňování zvlákňuje z povrchu této zvlákňovací elektrody 1, resp. jejího zvlákňovacího prvku/prvků. Pokud je délka zvlákňovací elektrody 1 blízká délce kolektoru 2, resp. požadované délce cévní náhrady, případně je větší, nemusí se během zvlákňování pohybovat podél kolektoru 2. Při použití těchto technologií, které jsou komerčně dostupné např. pod označením Nanospider™ (Elmarco) se současně dosahuje nejvyšší rovnoměrnosti vytvářené vrstvy vláken, zejména nanovláken.

V jiné neznázorněné variantě provedení lze namísto elektrostatického zvlákňování, kdy se na zvlákňovací elektrodu 1 přivádí vysoké stejnosměrné napětí určité polarity a případně na kolektor 2 napětí opačné polarity, nebo je kolektor 2 uzemněn, lze využít také způsob dle CZ 304137, kdy se elektrické pole pro elektrostatické zvlákňování vytváří mezi zvlákňovací elektrodou 1, na kterou se přivádí vysoké střídavé napětí, a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými a/nebo přivedenými do jejího okolí. Podle aktuální fáze střídavého napětí se pak na zvlákňovací elektrodě 1, resp. jejím zvlákňovacím prvku/prvcích vytváří polymerní vlákna s opačným elektrickým nábojem a/nebo s úseky s opačným elektrickým nábojem, která po svém vzniku v důsledku působení elektrostatických sil vytváří objemový útvar, který se volně pohybuje ve směru gradientu elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody 1, a na kolektoru 2, který přitom nemusí být elektricky nabitý, a nemusí být vytvořen z elektrického materiálu, se zachytává mechanicky.

Kromě elektrostatického či elektrického zvlákňování je však možné pro výrobu polymerních nanovláken, mikrovláken nebo jejich směsi použít také odstředivé zvlákňování, kdy se roztok pro

zvlákňování vytlačuje odstředivou silou z otvorů vytvořených v plášti rotujícího tělesa ve tvaru disku (např. ve smyslu DE 102005048939) nebo válce (např. ve smyslu JP 2008127726).

5 Ve všech variantách pak může být vzájemné prostorové uspořádání jednotlivých prvků daného zařízení jiné než na obr. 1 a 2, přičemž směr zvlákňování může být nahoru, šikmo nahoru, dolů, šikmo dolů, případně do boku, případně se může kombinovat více směrů zvlákňováním. V kterékoliv variantě pak mohou být vytvářena vlákna 3 usměrňována a/nebo urychlována ke kolektoru 2, který může být uspořádán i jinak, než proti zvlákňovací elektrodě 1, resp. jejímu zvlákňovacímu prvku/prvkům, např. proudem vzduchu nebo plynu.

10 Po uložení vláken 3, která vytvoří vnitřní vrstvu cévní náhrady, se kolektor 2 s výhodou začne otáčet rychlostí alespoň 5000 otáček/min, při které se následně ukládaná vlákna vytvářející vnější vrstvu do značné míry paralelizují a orientují se po obvodu kolektoru, resp. vnitřní vrstvy cévní náhrady kolmo nebo v podstatě kolmo k podélné ose vytvářené cévní náhrady, čímž se dosáhne požadované struktury vnější vrstvy cévní náhrady vhodné pro zachycení a růst hladkosvalových buněk.

15 Po sejmutí z kolektoru 2 se vytvořená cévní náhrada sterilizuje, např. ethylenoxidem, a za vhodných podmínek se skladuje, přičemž může být bez dalšího okamžitě použita v klinické praxi.

20 Různé parametry jednotlivých vrstev cévní náhrady, zejména odlišná poréznost vnější vrstvy a vnitřní vrstvy se pak dosáhne použitím kopolymeru s jiným poměrem PLA a PCL a/nebo použitím jiného rozpouštědla/rozpouštědlového systému a/nebo jinými podmínkami zvlákňování při vytváření jednotlivých vrstev – např. vzdáleností zvlákňovací elektrody/elektrod 1 nebo jiného zvlákňovacího prvku/prvků od kolektoru 2 a/nebo velikostí a/nebo charakterem elektrického napětí přiváděného na zvlákňovací elektrodu/elektrody nebo její zvlákňovací prvek/prvky, a/nebo dobou zvlákňování, a/nebo rychlostí otáčení kolektoru 2, atd.

30 Na obr. 2 je pak znázorněná druhá varianta zařízení pro výrobu cévních náhrad podle vynálezu, u které je zvlákňovací elektroda 1 doplněna zařízením 4 pro dodávání a/nebo vytváření kapslí 5 z biologicky degradovatelného polymeru s alespoň jednou aktivní látkou. To je ve znázorněné variantě provedení tvořeno sprejovací kapilárou 5, která je pohyblivá podél kolektoru 2 společně se zvlákňovací elektrodou 1. V neznázorněných variantách provedení však může být toto zařízení tvořené sprejovací kapilárou 5 nebo jiným známým prostředkem, např. rozprašovačem, resp. sprejovací tryskou, apod., přičemž ve všech variantách provedení může být uspořádáno v prostoru nezávisle na zvlákňovací elektrodě/elektrodách 1. Vytvářené kapsle 4 se přitom nanáší buď samostatně na kolektor 2, resp. na již na něm uložená vlákna 3, případně do místa ukládání těchto vláken 3 na kolektor 2, nebo se zanáší do proudu vláken 3 a ukládají se na kolektor 2 společně s nimi. V případě potřeby pak může být použito více zařízení 4 pro dodávání a/nebo vytváření polymerních kapslí 5, což umožňuje do struktury cévní náhrady nebo její vrstvy/vrstev ukládat polymerní kapsle 5 z různých polymerů s odlišnou dobou rozkladu a/nebo s odlišnou aktivní látkou/látkami.

45

PATENTOVÉ NÁROKY

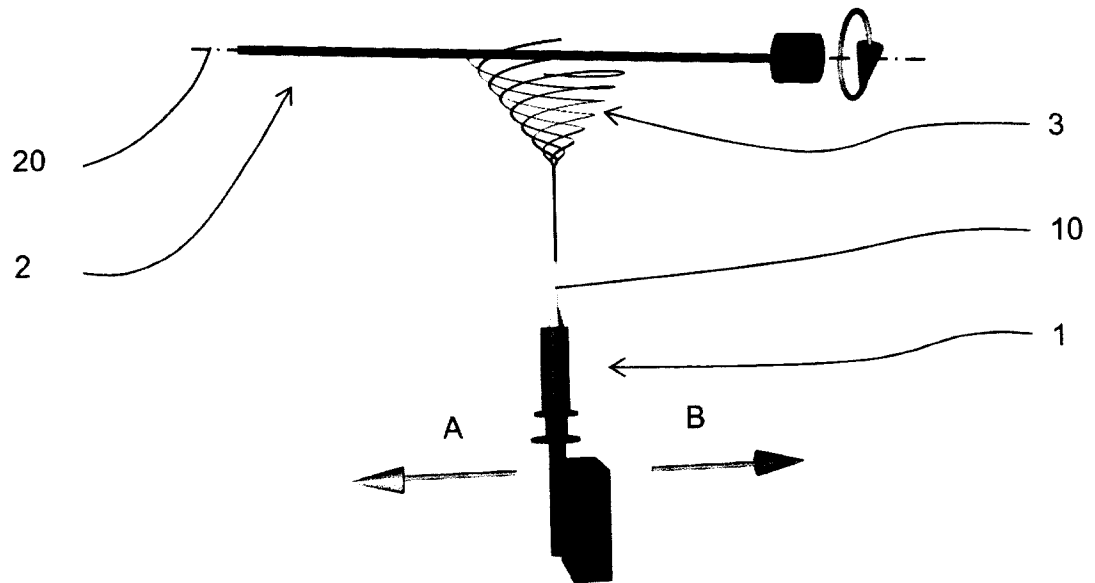
50 1. Cévní náhrada, zejména maloprůměrová cévní náhrada, **vyznačující se tím**, že obsahuje vnitřní vrstvu s tloušťkou 5 až 50 mikrometrů tvořenou náhodně uspořádanými nanovláknky z kopolymeru kyseliny polymléčné (PLA) a polykaprolaktonu (PCL), s poměrem PLA a PCL 9:1 až 1:9, a na ní uloženou vnější vrstvu s tloušťkou 100 až 300 mikrometrů tvořenou nanovláknky a/nebo mikrovláknky z kopolymeru kyseliny polymléčné (PLA) a polykaprolaktonu (PCL), s poměrem PLA a PCL 9:1 až 1:9, která jsou uspořádána po obvodu cévní náhrady, kol-

55

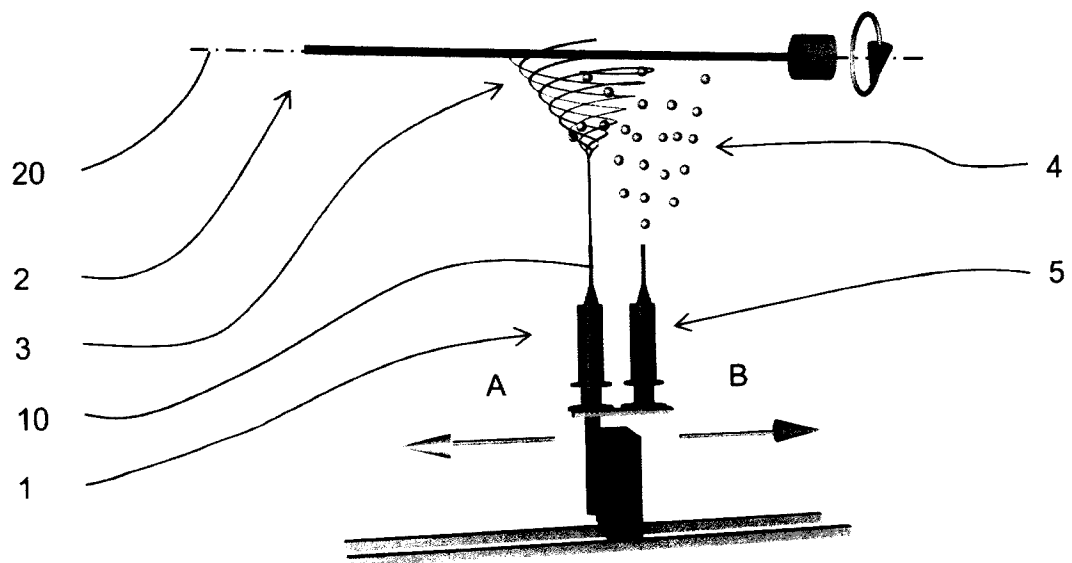
mo nebo v podstatě kolmo k její podélné ose, přičemž vnitřní vrstva má menší velikost pórů než vnější vrstva.

- 5 **2.** Cévní náhrada podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že na vnitřním povrchu její vnitřní vrstvy je navázán alespoň jeden adhezní protein.
- 10 **3.** Cévní náhrada podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že v její vnitřní vrstvě a/nebo v její vnější vrstvě je zakomponována alespoň jedna aktivní látka podporující růst endotelových buněk a/nebo omezující růst hladkosvalových buněk a/nebo potlačující srážení krve a/nebo potlačující či tlumící zánět.
- 15 **4.** Cévní náhrada podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že alespoň jedna aktivní látka je uložena v materiálu nanovláken a/nebo mikrovláken vnější vrstvy a/nebo vnitřní vrstvy cévní náhrady.
- 20 **5.** Cévní náhrada podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že alespoň jedna aktivní látka je uložena v kapslích z biologicky kompatibilního a biologicky degradovatelného polymeru, které jsou uloženy mezi nanovláknny a/nebo mikrovláknny vnější vrstvy a/nebo nanovláknny vnitřní vrstvy cévní náhrady.
- 25 **6.** Cévní náhrada podle nároků 3, 4 nebo 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že aktivní látkou je donor oxidu dusnatého (NO).

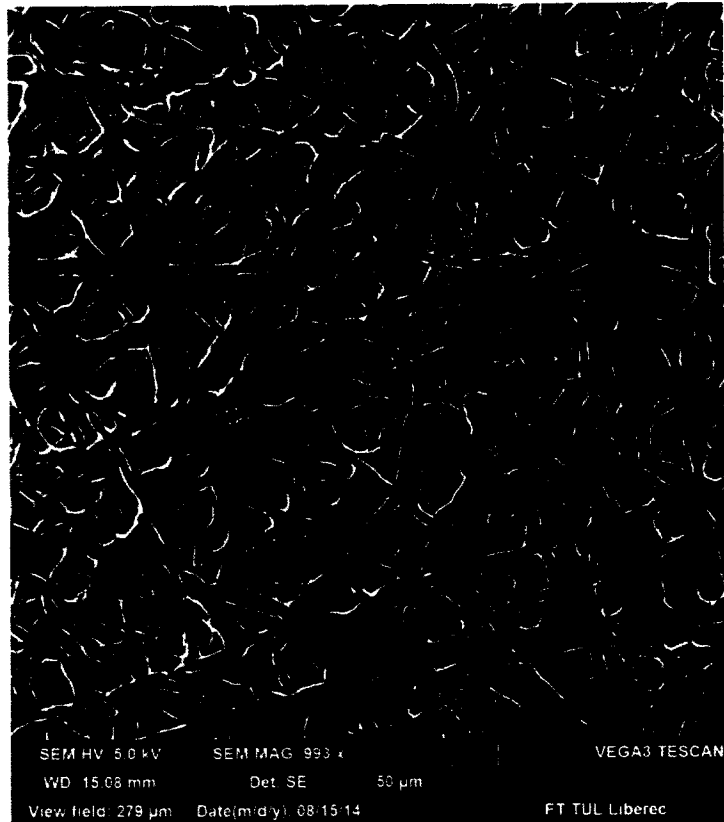
6 výkresů



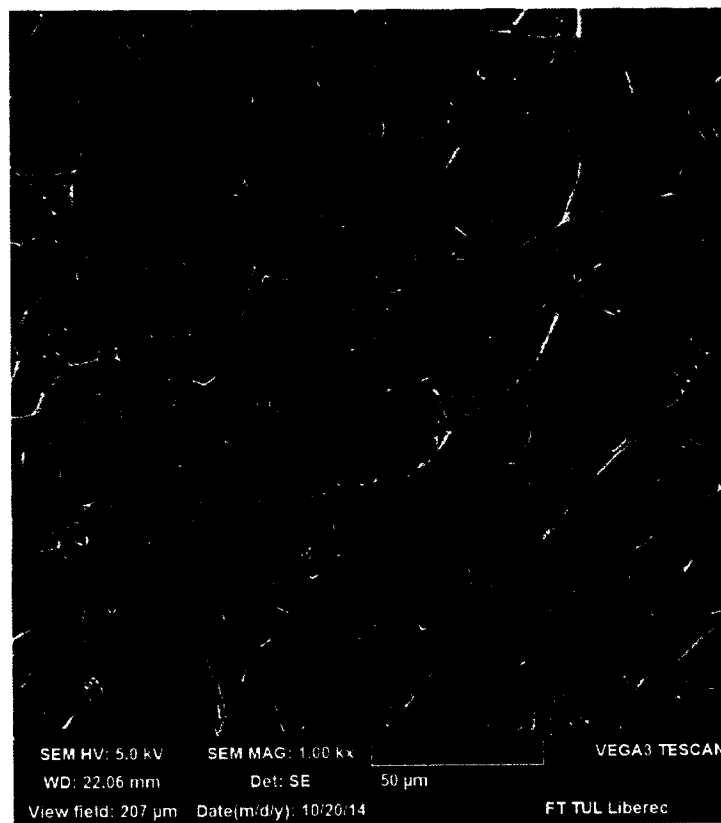
Obr. 1



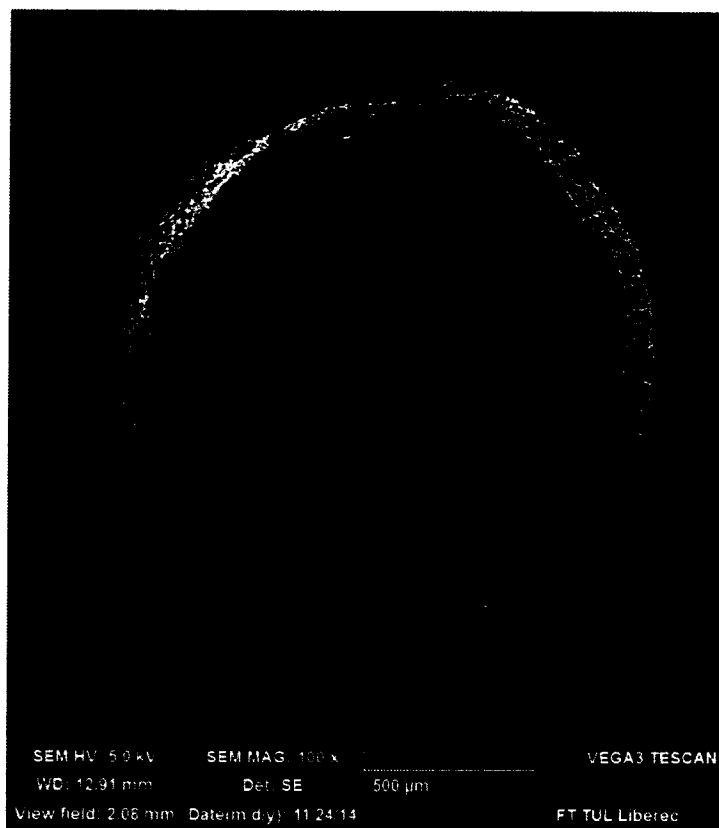
Obr. 2



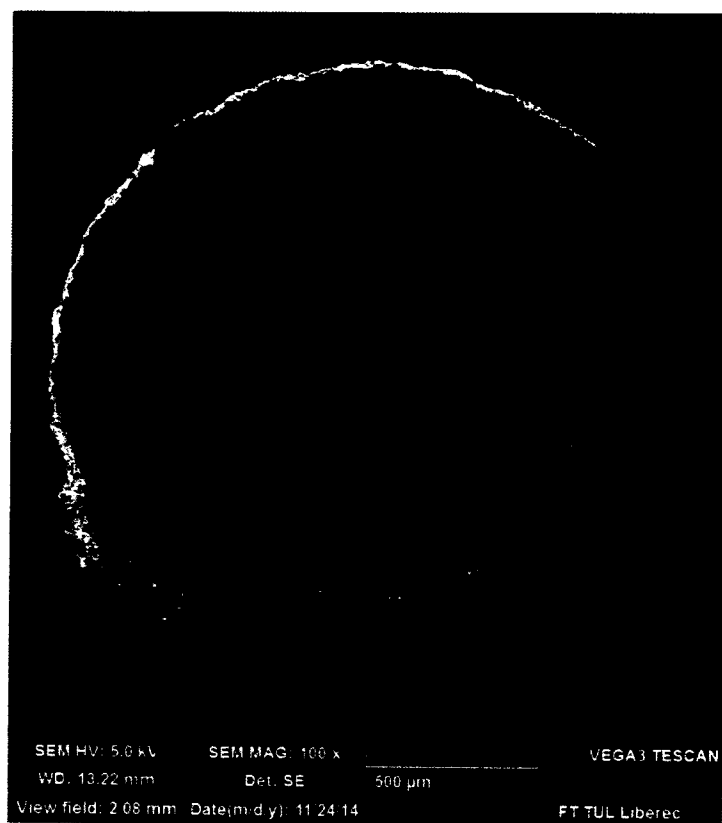
Obr. 3a



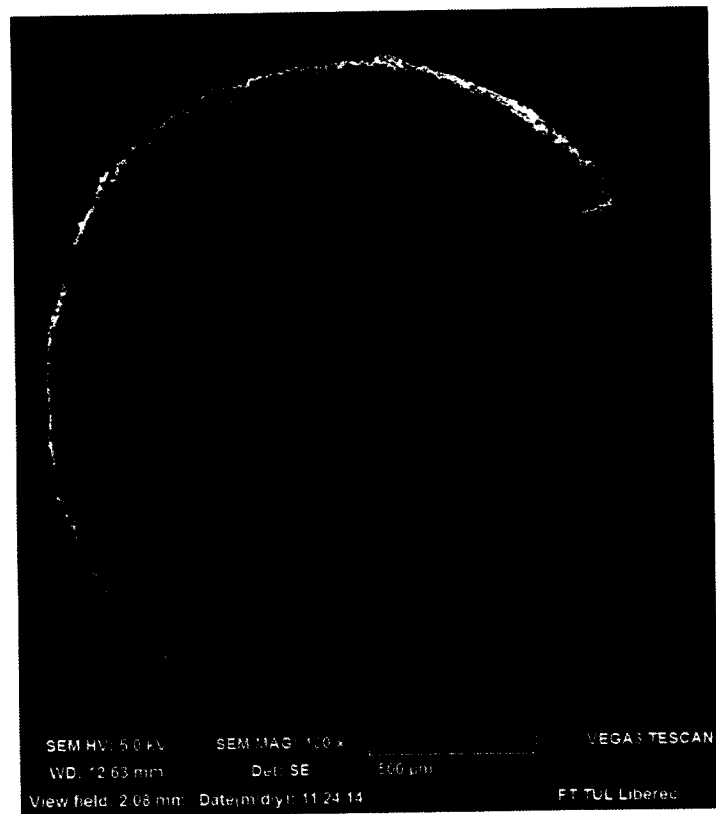
Obr. 3b



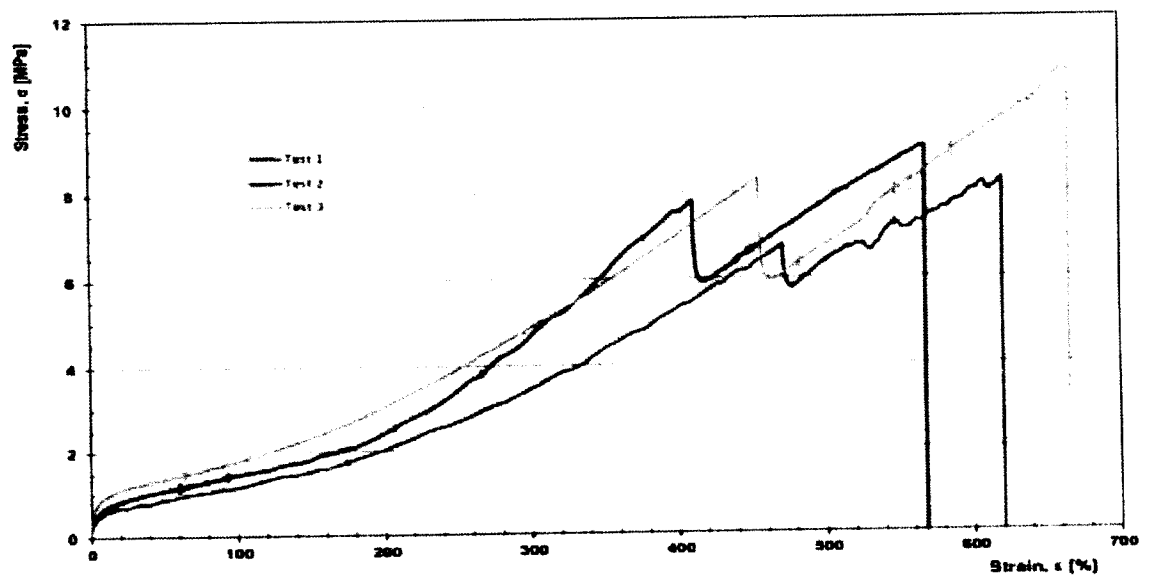
Obr. 4a



Obr. 4b



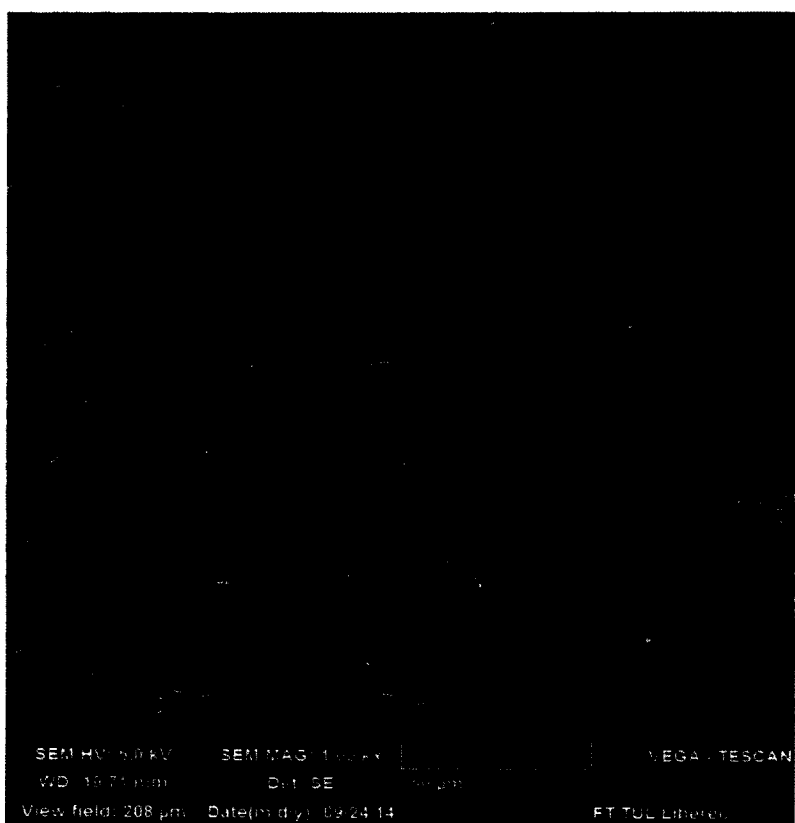
Obr. 4c



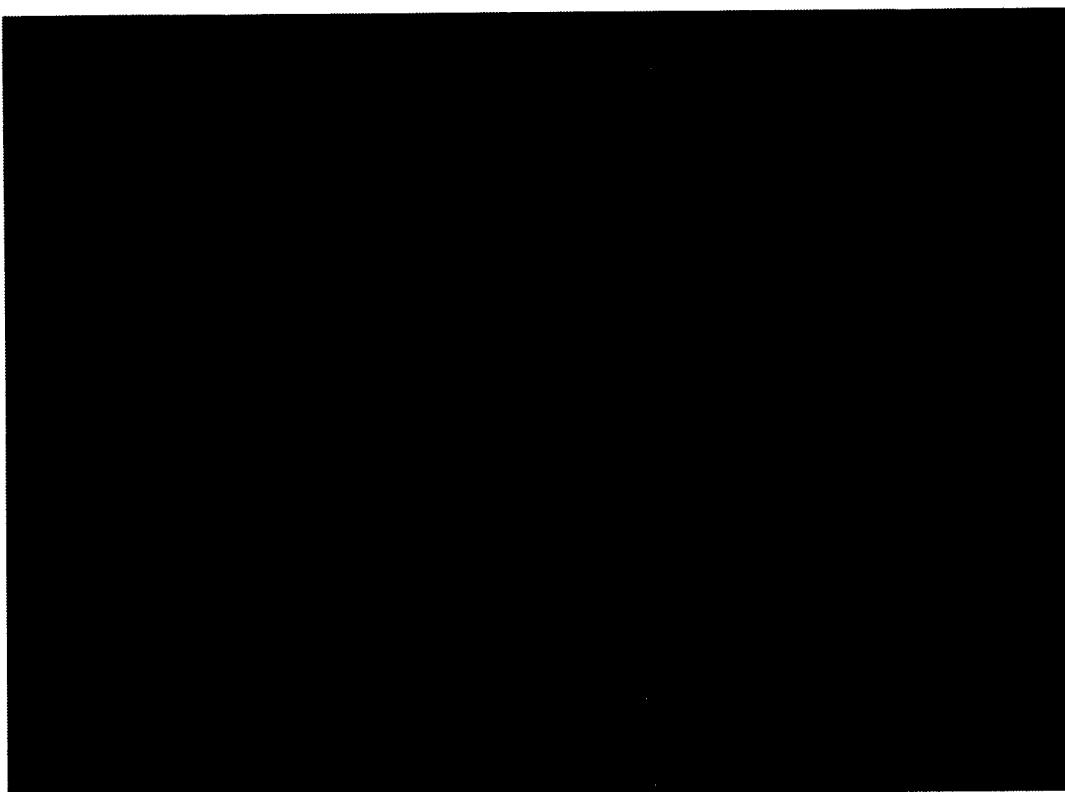
Obr. 5



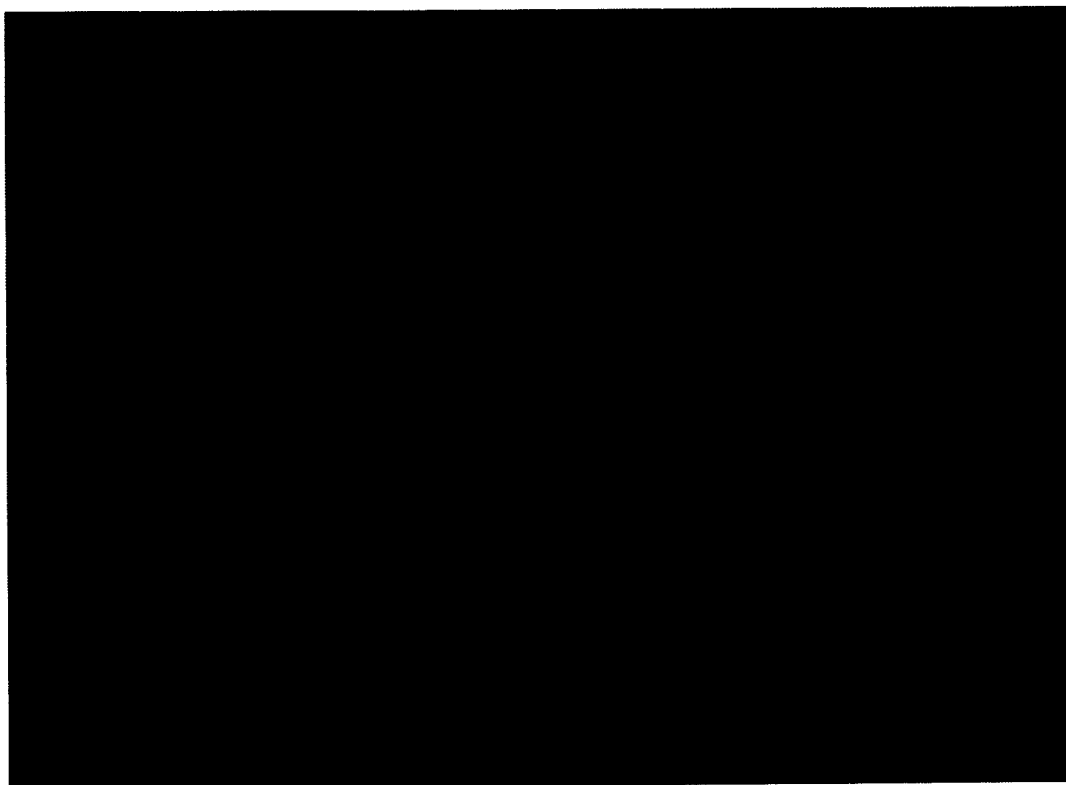
Obr. 6a



Obr. 6b



Obr. 7a



Obr. 7b

Konec dokumentu

Příloha č. 9

Patent: Vrstvený textilní materiál pro leštění tvrdých povrchů zahrnuje vrstvu netkané textilie a vrstvu nanovláken z polymeru polyvinyliden fluoridu.

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-732

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.10.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2017**
(Věstník č. 24/2017)

B32B 5/30 (2006.01)
B32B 5/24 (2006.01)
B32B 7/02 (2006.01)
B32B 27/18 (2006.01)
B24D 3/34 (2006.01)
B24D 11/02 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Technická univerzita v Liberci, Liberec, CZ
- (72) Původce:
Ing. Jiří Chvojka, Ph.D., Liberec, CZ
prof. RNDr. David Lukáš, CSc., Liberec 6, CZ
doc. Ing. Eva Kuželová-Košťáková, Ph.D., Turnov, CZ
Ing. Petr Mikeš, Ph.D., Mníšek u Liberce, CZ
Ing. Pavel Pokorný, Ph.D., Frýdlant v Čechách, CZ
Lenka Blažková, Jablonec nad Nisou, CZ
doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D., Turnov, CZ
Bc. Ondřej Brustmann, Turnov, CZ
- (74) Zástupce:
RETROPATENT s.r.o., Dobiášova 1246/29, 466 01 Liberec

- (54) Název přihlášky vynálezu:
Vrstvený materiál pro leštění tvrdých povrchů

- (57) Anotace:
Vrstvený materiál pro leštění tvrdých povrchů zahrnuje vrstvu netkané textilie a vrstvu nanovláken z polymeru polyvinyliden fluoridu se zabudovaným leštivem o velikosti částic od 0,04 μm do 500 μm, přičemž leštivo bylo dispergováno rovnoměrně v roztoku polymeru.

CZ 2015 - 732 A3

Vrstvený materiál pro leštění tvrdých povrchů

oblast techniky:

Vynález se týká vytvoření materiálu pro leštění tvrdých povrchů, který se bude skládat z polymerních nanovláken se zabudovanými částicemi nanoabraziv.

Dosavadní stav techniky:

Známé materiály pro leštění povrchů jsou textilní plsti nebo flanelové textilie. Plstěné materiály se převážně vyrábějí z přírodních vlněných vláken. Jedná se o technologii valchování a plstění, která vede k objemným a tuhým výrobkům. Flanelová textilie (flanel) je tkanina v keprové nebo plátnové vazbě, upravená česáním po jedné nebo obou stranách, vyrobená z viskózy, bavlny nebo vlny.

Z pravidla se známé textilie využívají jako leštící kotouče. Pro dosažení lepší drsnosti drsnosti se používají flanelové textilie. Tyto se používají převážně při ručním leštění. Nevýhodou těchto leštících prostředků je obtížnost a někdy také nemožnost jejich funkcionalizace.

Pro přesné (strojové) leštění se používají zejména syntetických podložek na bázi PES, PUR, syntetické gumy aj. v tloušťce max. 0,5 mm. Nároky na podložku jsou zejména tvarová trvanlivost a dostatečná smáčivost leštící suspenzí (pokud je nutné přidávat).

Cílem tohoto technického řešení je výroba tenké nanovlákněné vrstvy, která je funkcionalizovaná zabudovaným abrazivem, pro dosažení optimálního leštícího účinku.

Podstata vynálezu:

Cíle technického řešení je dosaženo vytvořením tenkého nanovlákněného materiálu se zabudovaným abrazivem, pro leštění tvrdých povrchů, který je vyrobený z polyvinylidenfluoridu (PVDF) pomocí elektrostatického zvlákňování. Tato nanovlákněná vrstva může být použita ve standardních leštících strojích.

Optimalizace morfologických a mechanických vlastností je dosaženo kombinací následujících rozpouštědel. Aceton v poměru 10-50%, benzaldehyd v poměru 30-50%, tetrahydrofuran v poměru 10-100%, dimetylacetamid 10-100%, dimetylformamid 10-100%, dimetylsulfoxid 30-70% a dále pak vytvořením jejich vhodných poměrů (směsí).

Další možnosti optimalizace jsou parametry vzdušniny ve zvlákňovacím prostoru (zejména kontrola relativní vlhkosti).

Vznikající nanovláknenná vrstva je nanášena na podkladový materiál tvořený z polypropylenové netkané textilie.

Kontakt mezi nanovláknennou vrstvou a netkanou textilií tvoří adhezní síly vznikající přímo při výrobě nanovláken, kdy je netkaná textilie použita jako substrát. Sílu adhezní vrstvy lze ovlivnit použitím pojiv, a/nebo plasmatickou úpravou těsně před nanesením vrstvy nanovláken.

Zabudování prášků je zajištěno použitím dispergace prášku v polymerním roztoku. Je nutné dispergovat přesně dané množství pro zaručení optimální viskozity polymerního roztoku. Dispergace prášku je prováděna sonifikací pomocí ultrazvuku.

Optimálního leštícího účinku se dosáhne při plošné hmotnosti $50-200\text{g/m}^2$. Výhodou tohoto materiálu je jednoduchost jeho výroby a díky funkcionalizaci nanovláknenné vrstvy možnost ovlivňovat mechanicky proces leštění, složením leštícího materiálu. Proces je vhodný pro laboratorní i průmyslové procesy leštění na stávajících zařízeních, bez nutnosti jejich úpravy.

Textilní materiál se zabudovaným abrazivním práškem bude využit pro proces leštění, případně dolešťování přesných optických elementů.

Příklad provedení vynálezu:

Podle jednoho příkladného provedení funkcionalizovaného leštícího kotouče je použit polypropylenový spunbond se smáčivou úpravou o plošné hmotnosti 50g/m^2 pojený rastrovaným kalandrem a střední průměru vláken $20\text{ }\mu\text{m}$. Nanovláknenná vrstva je nanesena přímo na spunbond, který slouží jako substrát pro stejnosměrné bezjehlové elektrostatické zvlákňování. Pro zvlákňování je použit polyvinyliden fluorid (PVDF) o molekulové hmotnosti $M_w 50.000\text{ g/mol}$. Směsný rozpouštědlový systém je tvořen dimethylacetamid (DMAc) a aceton (Ac) ve hmotnostním poměru 8:2. Koncentrace polymeru je 16 hmotnostních %. Relativní vlhkost je nastavena na 55%. Abrazivní prášek je dispergován přímo ve zvlákňovacím roztoku. Z nanovláknny povrstveného spunbondu je vyseknut kruh o požadovaném průměru pro dané leštící zařízení. Umístění nanovláknenné vrstvy na leštícím kotouči je na lící nebo rubové straně nástroje.

Optimální rozměry částic abrazivního materiálu se pohybují od $0,04\text{ }\mu\text{m}$ do $500\text{ }\mu\text{m}$, v ideálním případě distribuce částic dosahuje $14,17\text{ }\mu\text{m}$. Prášek je dispergován v hmotnostním podílu 10% optimální dispergace je dosaženo pomocí sonifikačního ultrazvukového zařízení Qsonica.

Průmyslová využitelnost

Technické řešení je využitelné pro leštění tvrdých kovových, krystalický materiálů nebo skel pro špičkové použití v optice, rentgenové optice, aj. Materiál je aplikovatelný bez provedení úprav na

stávajících zařízeních. Pro některé materiály je leštící účinek kotouče vytvořeného podle tohoto průmyslového vzoru lepší než u leštících materiálů stávajících. Zejména odpadá nutnost přimazávání leštící suspenze.

14. 10. 15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vrstvený materiál pro leštění tvrdých povrchů **vyznačující se tím, že** zahrnuje nejméně jednu vrstvu netkané textilie – polypropylenové netkané textilie 18-25g/m² (spunbond) a vrstvu nanovláken z polymeru polyvinyliden fluoridu se zabudovaným leštivem o velikosti částic od 0,04μm do 500 μm, přičemž leštivo je dispergováno rovnoměrně v roztoku od 3% do 30% hmotnostního podílu.

Příloha č. 10

Kapitola v monografii: Lukas David, Sarkar Arindam, Martinova Lenka; et al.: Physical principles of elektrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century,) Volume 41, Pages 59-140, Published: May 14 2009 (IF Journals indexed in the ESCI)

This article was downloaded by: [Clemson University]

On: 4 September 2009

Access details: Access Details: [subscription number
784173612] Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer
House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Textile Progress

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t778164492>

Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)

D. Lukáš^a; A. Sarkar^a; L. Martinová^a; K. Vodsed'áková^a; D. Lubasová^a; J. Chaloupek^a; P. Pokorný^a; P. Mikeš^a; J. Chvojka^a; M. Komárek^a

^a Department of Nonwovens, Faculty of Textile Engineering, Technical University of Liberec, Liberec, Czech Republic

Online Publication Date: 01 June 2009

To cite this Article Lukáš, D., Sarkar, A., Martinová, L., Vodsed'áková, K., Lubasová, D., Chaloupek, J., Pokorný, P., Mikeš, P., Chvojka, J. and Komárek, M. (2009) 'Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)', *Textile Progress*, 41:2, 59 — 140

To link to this Article: DOI: 10.1080/00405160902904641

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/00405160902904641>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)

D. Lukaš^{*}, A. Sarkar, L. Martinova, K. Vodsed'alkov'a, D. Lubasova,
J. Chaloupek, P. Pokorný, P. Mikes, J. Chvojka and M. Komarek

*Department of Nonwovens, Faculty of Textile Engineering, Technical University of
Liberec, Studentska' 2, Liberec 461 17, Czech Republic*

(Received 3 March 2009; final version received 7 April 2009)

The history of electrospinning is briefly introduced at the beginning of the article. The fundamentals of the process are then analysed physically to be translated into a successful technology. Self-organisation of fluid in electrospinning is perceived as a consequence of various instabilities, based on electrohydrodynamics and, thus, highlighted as a key factor, theorising the subject successfully to elevate it to a highly productive technology to manufacture nano-scale materials. The main physical principle of the self-organisation is appearance of unstable tiny capillary waves on liquid surfaces, either on a free liquid surface or on that confined in a capillary, which is influenced by external fields. The jet path is described, as well as its possible control, by special collectors and spinning electrodes. Two electrospinning variants, i.e. melt and core-shell electrospinning, are discussed in detail. Two scarcely referred exceptional features of electrospinning, electric wind and accompanying irradiations, are introduced in in-depth detail. Lastly, care is taken over the quality of polymeric solutions for electrospinning from the standpoint of Hansen solubility parameters and entanglements among polymeric chains.

Keywords: electrospinning; electrospinning variants; nanofibres; liquid jet; self-organisation; dielectric diffusion; radiation; polymer solution

5. Special collectors

The concept of special collectors in electrospinning is very topical but unfortunately neither much explored nor frequently referred to. Probably the first modern concept working on special collectors was presented by Wannatong et al. [58], who used a rotating drum wrapped by an aluminum foil to collect electrospun fibres. Wannatong observed and described various effects of a drum movement on fibre mass properties. It was found that nanofibres grasped by a whirling drum dried faster than in common apparatuses with fixed collectors and, as supposed, they were aligned in a more isotropic manner depending on the drum's peripheral velocity. On the other hand, surprisingly, even the earliest works on electrospinning: Morton [8], Cooley [59] and Formhals [11], suggested how to use rotating wheels/reels to collect heaps of nanofibres in yarn-like structures. Recently, it is acknowledged in general that special collectors have a significant effect on morphology of resultant nanofibrous layers produced by electrospinning and so they are used to control fibre mass anisotropy, homogeneity, patterning, porosity, etc.

Application of a special collector is based on the fact that a spatial distribution of electric field has a significant effect on the jet path and, consequently, on geometrical features of the deposited electrospun layer. Even fixed grounded special collectors, consisting of conductive and non-conductive patterns, are able to invoke influential control over the local deposition of nanofibres. Inside the class of special collectors it is also very common to use one or more auxiliary electrodes. To manipulate the external electric field so as to exert some control on the electrospinning jet, the shape, position and a potential of the auxiliary electrode(s), relative to the potential of an electrospinning jet, have to be considered, suggested by Teo and Ramakrishna [60]. The effect of auxiliary electrode action on a jet path is also described in sub-section 7.1 of this work.

Special collectors can be divided into two main groups. The first of which consists of static collectors, while the last encompasses dynamic collectors, e.g. rotating collectors or collector performing any other movement. Dynamic spinning electrodes will also be discussed further within the last group. The idea of special static collectors is based on the fact that, in spite of wild whipping and gyrating electrospinning jets, nanofibres can be selectively attracted by inhomogeneous electrostatic field in the vicinity of patterned collectors. More details about this astonishing finding will be discussed in the theoretical part of this section. An alternative and more detailed approach to the division of special collectors has been introduced by Teo and Ramakrishna [60]. Their classification is based on a structure of a resultant nanofibrous layers.

5.1 Static collectors

In standard electrospinning set-ups, collectors are made of conductive materials, commonly metals such as aluminium or copper. Standard collectors are homogenous and so the electric field in the vicinity of them is nearly homogenous too. On the other hand, special static collectors consist of conducting and non-conducting materials that are distributed in appropriate patterns. These patterns cause electrostatic charges not to be homogeneously distributed in them. Obviously, the electric charge density is less on non-conducting and much higher on conducting areas of a pattern. The consequence of the inhomogeneous charge distribution is an uneven electrostatic field in the vicinity of the collector. So, charged jets/nanofibres are collected on the non-conducting areas with lower packing density compared to their density on conducting parts, if they are charged oppositely relative to the jet type of charge.

Figure 22 shows a specimen of a static special collector composed of conductive and non-conductive parallel strips. It was approved that nanofibres in the set-up were preferentially deposited on the conducting strips, as obvious from the same figure. Between these strips, the sparse nanofibrous collection is strongly isotropic and nearly perpendicular to the strips, as supported by polyvinylalcohol (PVA) fibres electrospun from their aqueous solution in Figure 23a. The explanation of the parallelism lies in qualitative investigation of electrostatic forces acting on a piece of an electrospun jet/nanofibre in the vicinity of the neighbouring pair of conductive strips. Suggesting that the flying nanofibre piece carries an opposite charge to the charge on both conductive strips. So, both of them attract nanofibrous elements more than non-conductive parts of the special collector and the nanofibres align preferentially on individual strips are collected on them in piles. On the other hand, elements of the jet that appear in an area just in the middle above two neighbouring strips are equally attracted by them. These two electrostatic forces will simultaneously pull the piece of a fibre/jet towards both conductive strips causing a moment of force that will lead to a change in a fibre piece orientation. These moments of force will eventually lead to a uniaxial

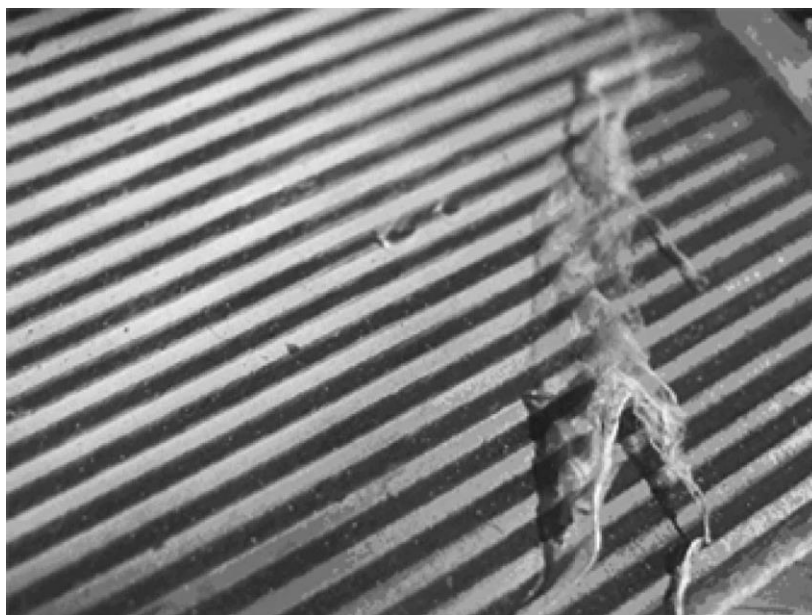


Figure 22. Special static collector consisting of Cooper strips on a laminate. Partially detached nanofibrous layer was prepared from PVA aqueous solution.

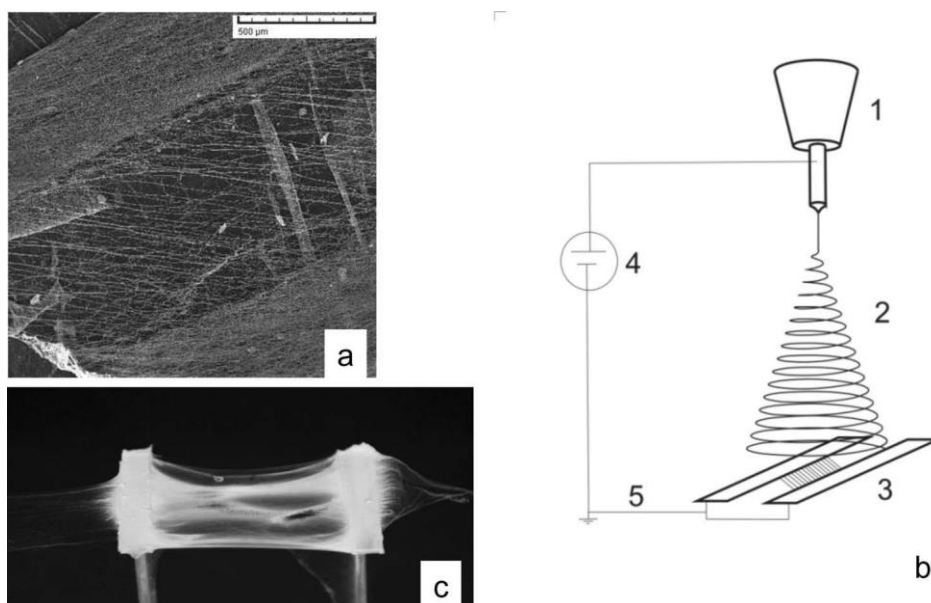


Figure 23. (a) Highly isotropic polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous layer collected between Cooper strips of the static special collector depicted in 22. (Courtesy of E. Kostakova, Technical University of Liberec.) (b) Schema of an apparatus consisting from a spinning electrode (1) and a high voltage source (4), where a coiled jet (2) is attracted by two charged strips serving as collector (3) that enable parallel alignment of nanofibres between the strips. Ground is denoted as (5). (c) A special collector, composed of two grounded metal strips, collected a highly oriented nanofibrous layer. The distance between the strips is 4 cm

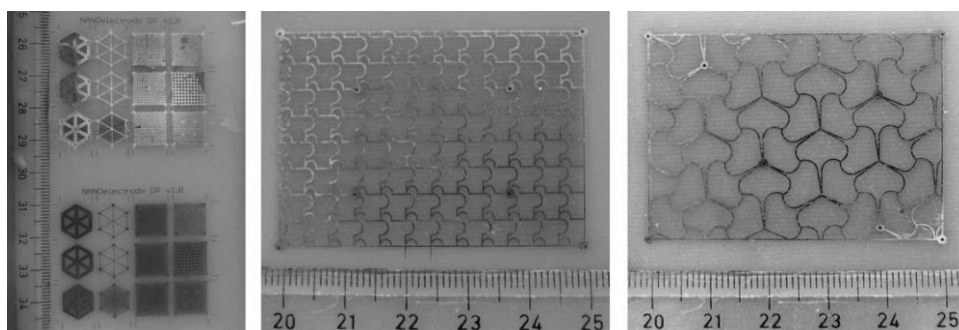


Figure 24. Three various static collectors designed as printed circuits with different shapes of conducting patterns. The attached scale is in centimetres.

alignment of a nanofibrous mass across the gap between neighbouring conductive strips, as sketched in Figure 23b. This orientation effect can be utilised for formation of oriented groups of elementary fibres to produce yarns formed by nanofibres.

More complex static-structured collectors are depicted in Figure 24. The three kinds of collectors shown there are made as flat-printed circuits without any three-dimensional elevations. The pattern thinness should be in the range of fractions of millimetre still keeping the chance for selective collection of nanofibres. This ability of nanofibres to be aligned selectively copying such fine patterns is surprising, since the field non-homogeneity spans outside the structured collector only on the distance comparable with the characteristic spacing of the pattern, as will be shown further in this section, vide Equation (5.5) and its commentary. Special structured collectors can also be designed as a combination of an insulator and two electrically independent groups of conductive patterns. The groups of conductors are then kept on different electrostatic potentials. One of these potentials can be chosen in such a manner that it is repulsive for the stream of impinging nanofibres/jets, and the other one as attractive. The fibrous mass, obtained on such a special collector, is a quite inhomogeneous sheet of nanofibres with empty and highly covered areas, as depicted in Figure 25.

Apart from two-dimensional special static collectors, there are also three-dimensional ones. An example of such a collector designed from a set of slender edges/lamellae is shown in Figure 26. On the top of each lamella accumulates electrostatic charge and, hence, electrospun nanofibres are deposited preferentially on the top of this kind of special, comb-like, three-dimensional collector. Various textures and spatial morphologies of nanofibrous meshes may be formed by using patterned three-dimensional collectors. For instance, several parallel combs of lamellae are able to create either voluminous nanofibrous piles, shown in Figure 27, that are potentially applicable for cultivation of living cells for tissue engineering, or these collectors can be exploited for production of pieces of yarns, as shown in Figure 28. Elementary fibres of these yarns have prevailing uniaxial orientation due to the effect, that has been described above, of nanofibrous elements orientation between two conductors, in this case lamellae, of a special structured comb-like collector.

Another kind of special porous collector could be engineered from the point of view of porosity. Porous collectors, as has been referred to by Liu and Hsieh [61], enhance diffusion and rate of evaporation of the residual solvent from the collected fibres. In a porous target, the faster solvent evaporation is due to the higher surface area that allows the solvent vapour to escape the sample, while compact collector surfaces may cause an

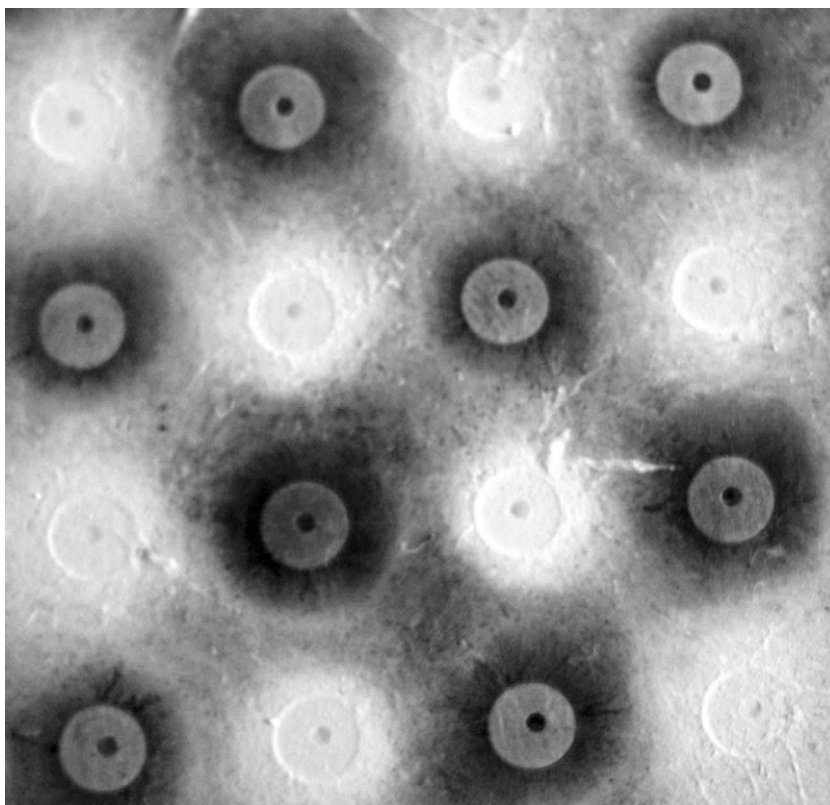


Figure 25. Special structured collector composed of combination of charged and uncharged circular patterns was covered by a white layer of PVA nanofibres.

accumulation of a solvent around the fibres due to the low solvent evaporation rate. As a consequence of wicking and diffusion of the residual solvents, the freshly collected fibres may be pulled together by capillary forces to constitute more densely packed structures. As the fibres dry faster on porous collectors, it is more likely that the residual charges remain longer on non-conductive dry collected fibres which can repulse following fibre collection.

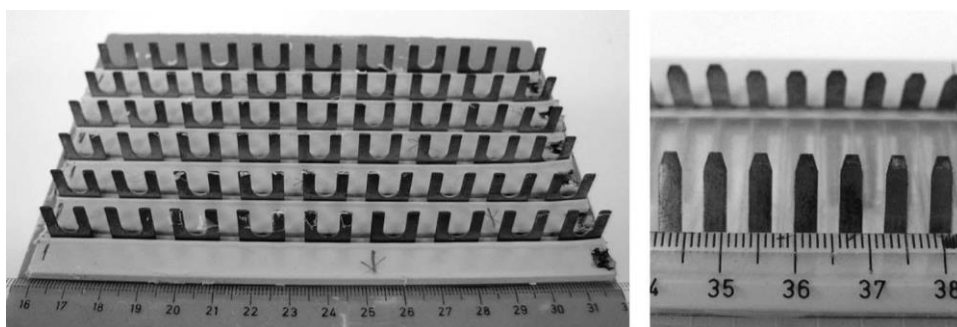


Figure 26. Two static special three-dimensional collectors composed of combs of metallic lamellae.

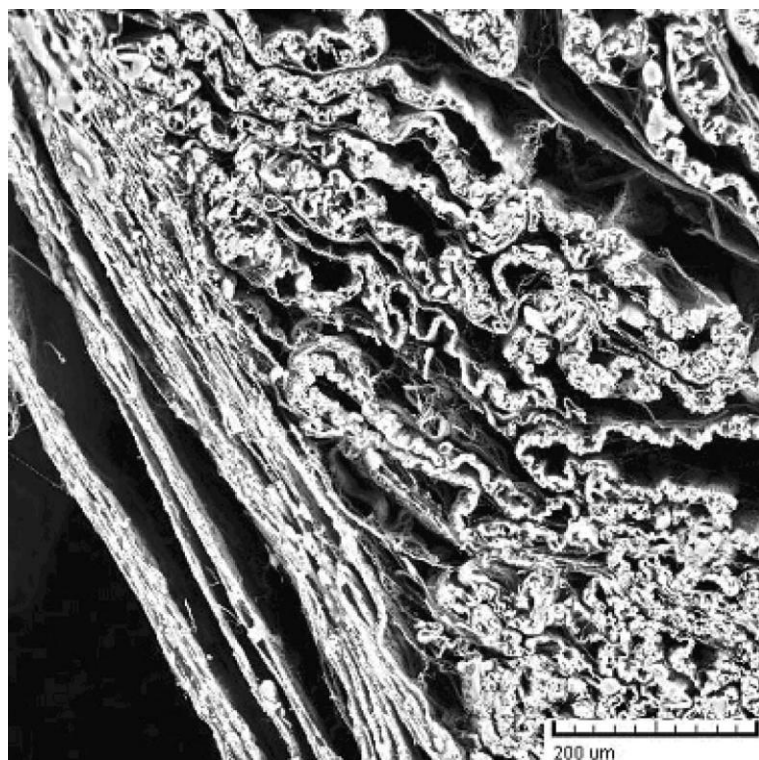


Figure 27. A cross-section of a three-dimensional voluminous nanofibrous mass, collected using a comb-like special collector depicted in the left-hand part of (26). (Courtesy of E. Kostakova, Technical University of Liberec.)

However, on a smooth surface, the residual solvents will support the residual charges to be conducted away to the collector.

5.2 Dynamic collectors and spinning electrodes

Next family of special collectors constitutes three-dimensional movable ones, as discussed by Sundaray et al. [62]. The special movable collector could be a drum made from homo-geneous conductive material or it could be also realised as a wire drum. Rotation of the conducting collector may result in a formation of aligned fibre structures. Effect of rotating collector on fibre alignment is caused by mechanical drag force transmitted by trapped nanofibres; therefore, the fibres are parallelised depending on the speed of revolution of the drum. However, even for the conductive collector, when the deposition rate is high and the fibre mesh is thick enough, there is a high accumulation of residual charges on the fibre mass since polymer nanofibres are generally non-conductive. This collected charged fibrous layer repels next nanofibres from the collector.

When a rotating collector is used to collect aligned fibres, the movement of the yielded nanofibrous materials assists in their drying. This is useful because certain polymer solvents, such as DMF, have a high boiling point that may result in collection of very wet fibres. A rotating collector will give the solvent more time to evaporate, as highlighted by Wannatong

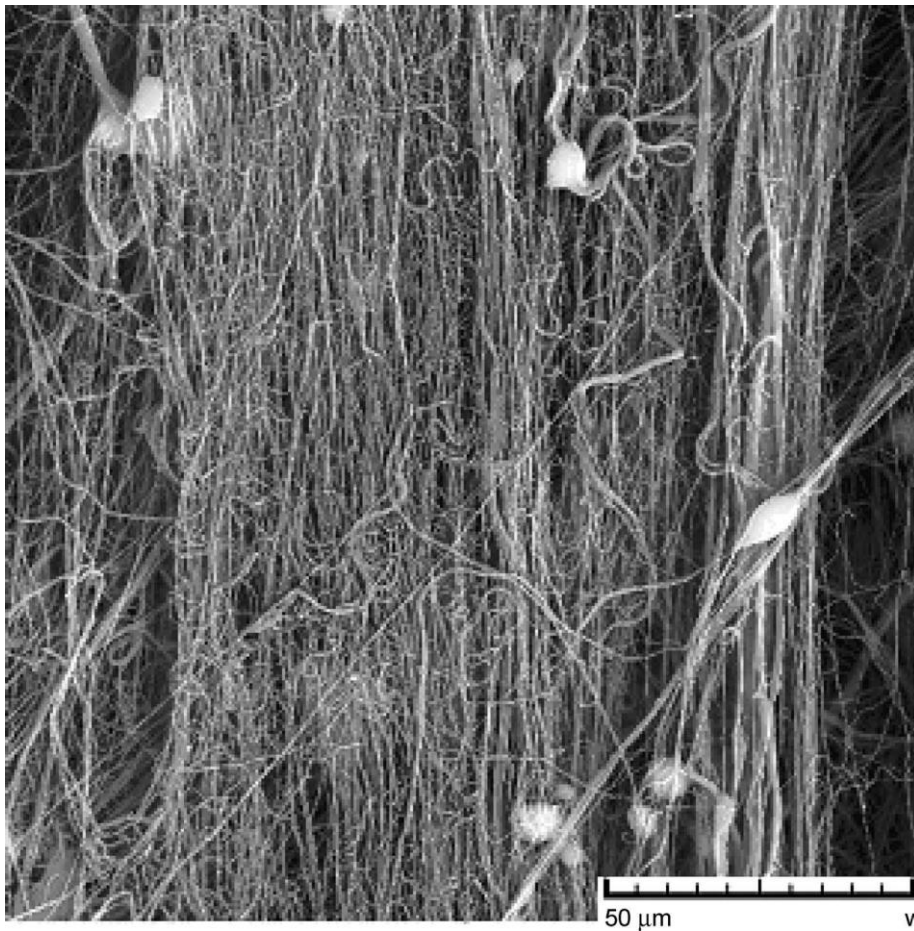


Figure 28. A detailed view of a yarn with nanofibres oriented along the yarn axis. (Courtesy of E. Kostakova, Technical University of Liberec.)

et al. [58]. More intensive evaporation improves the morphology of the fibre layers where distinct fibres are required.

The last way to create some especially arranged nanofibrous layers that is mentioned here is the utilisation of special spinning electrodes instead of simple common collectors, e.g. fixed needles or rods. For instance, the fixed metallic rod, introduced in Figure 29, has been used to prepare nanofibrous specimens depicted in Figure 25. Shape of spinning electrode affects electrostatic field-like collector shape, and hence it is possible to influence a jet path as well as the structure of the final nanofibrous layer in this way. If a special rod-like spinning electrode, depicted in Figure 30, rotates along its vertical axes, then angular velocity of the revolution regulates the diameter of the nanofibrous layer deposited on a collector. Higher angular velocities provide with bigger diameters of collected nanofibrous layers, as shown in Figure 31. Also, depending on diameter of rotation of the spinning electrode, one could say that is continual proportion.

A special spinning electrode shaped as a rotating cylinder was first introduced by Jirsak et al. [14] under the brand name of NANOSPIDERTM. The cylinder slowly rotates in a pool,

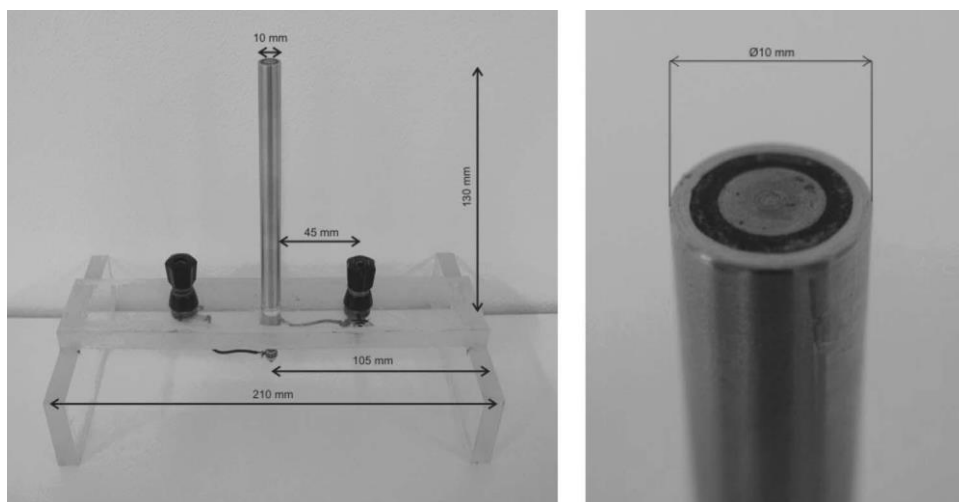


Figure 29. The rod-like spinning electrode for production nanofibrous layer and detailed top view of it.

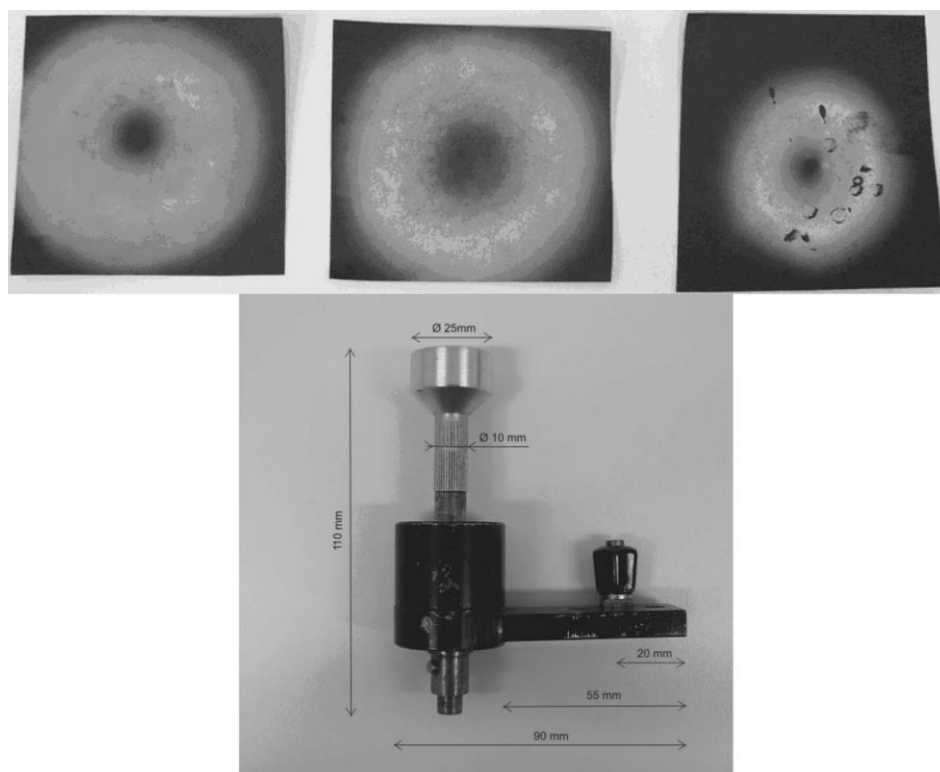


Figure 30. The rod-like spinning electrode that can rotate along its vertical axis: nanofibres are trapped by a collector in circular spots whose radii depend on the velocity of revolution, as shown in the upper part of the figure.



Figure 31. The rotating cylinder for production nanofibrous layer according to the innovative patent of Jirsak et al. [14].

filled with a polymeric solution, as depicted in Figure 31. The electrostatic field organised between the cylinder and a parallel oblong collector enables the self-organisation of jets along the upper surface of the cylinder (Figure 32) and, hence, nanofibres cover the collector in long oblong-like spot, whose length matches the length of the cylinder. If nanofibres are collected on a thin textile substrate, localised just before the collector and drawn slowly away from a spinning zone, then ‘infinite’ two-ply fabric, comprising a nanofibrous layer, are continuously produced.

5.3 Electrostatic field in a vicinity of a charged grid

As has been highlighted previously, special collectors are mainly designed to influence an electrostatic field in a spinning zone. Hence, it is critical to investigate electrostatic field mainly in a vicinity of structured conductive bodies. As a model, a stripped special collector will serve here as a charged regular grid of parallel wires lying in a plane having a uniform distance, a , between neighbouring wires (consult Figure 33 with indicated cross-sections of equipotential surfaces). Since the wires are placed parallel to each other, the electric field has translational symmetry along the direction parallel to the wire axes. The electrostatic potential ϕ outside the wires satisfies the Laplace Equation $\nabla^2 \phi = 0$. Considering the wires being oriented along y -axis, Laplace Equation reduces to

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} = 0. \quad (5.1)$$

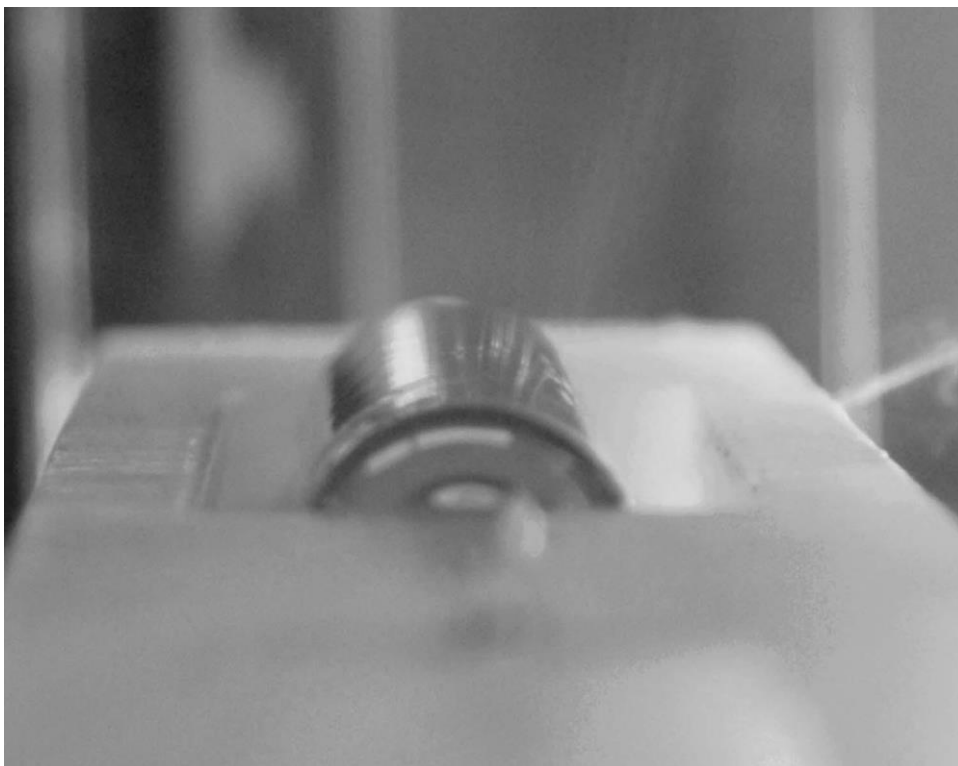


Figure 32. Side view of a special spinning electrode, applied in NANOSPIDERTM: Jets are self-organised on the upper part of surface of a long cylinder that slowly rotates in a pool filled with a polymeric solution.

Feynmann et al. [33] suggested the following trial solution of the aforementioned reduced Laplace Equation:

$$\phi(x, z) = F_n(z) \cos kx, \quad (5.2)$$

where the wave number k is equal to $2\pi/a$, since the distance between neighbouring fibres plays the role of a wavelength of undulating equipotentials, and $F_n(z)$ are originally unknown functions of z . The axes z is perpendicular to the plane of the wire grid. The

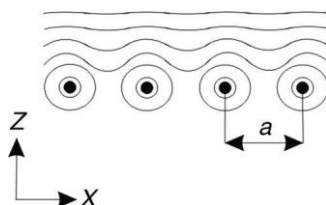


Figure 33. A grid of parallel wires: tiny wires oriented perpendicularly to the plane of the drawing are equidistantly separated along the axis x . The axis z is oriented perpendicularly to the plane of wires.

solution proposal substituted into Equation (5.1) gives

$$-\frac{4\pi^2 n^2}{a^2} F_n(z) \cos kx + \frac{d^2 F_n(z)}{dz^2} \cos kx = 0. \quad (5.3)$$

Hence, the functions $F_n(z)$ have to fulfil the following standard differential equation:

$$\frac{d^2 F_n(z)}{dz^2} - k^2 n^2 F_n(z) = 0. \quad (5.4)$$

Solving Equation (5.4) with constant coefficients gives the solution as

$$F_n(z) = A_n \exp(-z/z_0), \quad (5.5)$$

where $z_0 = a/(2\pi n)$ and A_n are constants. Hence, the n th Fourier component of the electrostatic field $\phi_n(x, z) = A_n \exp(-z/z_0) \cos(x/z_0)$ decreases exponentially with the characteristic scale length z_0 . Higher is the component order n , quicker is the decrement of field with the increasing distance from the plane of the grid. Within a distance from the grid that is not greater than the characteristic pattern spacing, a , the field is nearly homogeneous because the oscillating components of the field ϕ_n , for $n > 0$, are negligibly small. Behind this distance remains merely the zero harmonic component of the field ϕ_0 , for which $n = 0$ and $\phi_0 = -E_0 z$, where E_0 is the field intensity on ‘sufficiently long’ distances from the plane of the grid.

It is supposed as well as experimentally proven, see sub-section 7.1, that polymer jets are speedily discharged during their path through their whipping zones, due to interactions of their net charges with conversely charged ambient ions. Then, nearly dried and almost neutral nanofibres strike the collector. Surprisingly, despite a massive loss of their net charge, it is possible to pattern nanofibrous layers with accuracy 0.1 mm using static special collectors and fabricate nanofibrous patterned layers. It has also to be underlined that special spinning electrodes are probably the best tools for elevating electrospinning technology to industrial levels.

Acknowledgements

D. Lukas and J. Chaloupek are thankful to The Ministry of Education of the Czech Re-public, the project CEP1-1M0554, for their support in the frame of The Research Centre for Advanced Conservation Technologies. A. Sarkar, P. Mikes and J. Chvojka have been supported by GACR, grant no. 102/08/H081 ‘Nonstandard application of physical fields’. L. Martinova and K. Vodsedalkova have been granted by GAAV, grant no. IAA500390702 ‘Nanofibrous scaffolds for tissue engineering’. L. Martinova, D. Lukas and K. Vodsedalkova have been granted by GAAV, grant no. IAA500390702 ‘Nanofibrous scaffolds with lipo-somes for tissue engineering’. L. Martinova and D. Lubasova have been supported by GACR, grant no. 304/07/1129 ‘Polarised cultures of hepatocytes and mesenchymal cells on the nanofibre membranes in the experimental bioreactor’. Next co-author P. Pokorny is thankful for the support granted by MPO CR, grant no. FT-TA3/017. It would also not be out place to express our gratitude to the National Radiation Protection Institute, Czech Republic and FOMA Czech Republic for their valued advice and discussions in analysing various kinds of radiation. Authors also thank the companies ELMARCO and CUMMINS Filtration for their support and interest in this work.

References

[1] Y. Filatov, A. Budyka, and V. Kiriheenko, *Electrospinning of Micro and Nanofibres: Fundamentals and Preparation and Filtration Processes*, Beigel House Inc

- ., Redding, CT, 2007.
- [2] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. Teo, T. Lim, and Z. Ma, *An Introduction to Electrospinning and Nanofibres*, World Scientific Publishing Co., Singapore, 2005.
- [3] D.H. Reneker and H. Fong, *Polymeric Nanofibres*, Oxford University Press, Washington, D.C., 2005.
- [4] D.H. Reneker and A.L. Yarin, *Polymer* 49 (2008), p. 2387.
- [5] A.I. Grigor'ev and S.O. Shir'aeva, *J. Phys. D Appl. Phys.* 23 (1990), p. 1361.
- [6] R.P. Gwinn, *The New Encyclopedia Britannica*, Vol. 5, Encyclopedia Britannica Inc., Chicago, 1991.
- [7] A. Nollet, *Recherches Sur les Causes Particulieres des Phenomenes Electriques*, les Freres Guerin, Paris, 1749.
- [8] W.J. Morton, *Method of Dispersing Fluids*, U.S. Patent No. 705 691, 1902.
- [9] J. Zeleny, *Phys. Rev.* 3 (1914), p. 69.
- [10] J. Zeleny, *Phys. Rev.* 10 (1917), p. 1.
- [11] A. Formhals, *Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads*, U.S. Patent No. 1 975 504, 1934.
- [12] C.L. Norton, *Method of and Apparatus for Producing Fibrous or Filamentary Material*, U.S. Patent No. 2 048 651, 1936.

- [13] Y.N. Filatov, *Electrospinning of Fibrous Materials [in Russian]*, Neft' i Gas Publishing House, Moscow, 1977.
- [14] O. Jirsak, F. Sanetnik, D. Lukas, V. Kotek, L. Martinova, and J. Chaloupek, *A Method of Nanofibres Production from a Polymer Solution Using Electrostatic Spinning and a Device for Carrying Out the Method*, U.S. Patent No. WO2005024101, 2005.
- [15] L. Rayleigh, *Phil. Mag.* 14 (1882), p. 184.
- [16] G.F. Taylor, *Math. Phys. Sci.* 280 (1964), p. 383.
- [17] G.F. Taylor and M.D. Van Dyke, *Proc. R. Soc. Lond. A* 313 (1969), p. 453.
- [18] J.B. Matthews, *J. Geophys. Res.* 72 (1967), p. 3007.
- [19] L.D. Landau and E.M. Lifshitz, *Electrodynamics of Continuous Media*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1984.
- [20] J. Doshi and D.H. Reneker, *J. Electrostat.* 35 (1995), p. 151.
- [21] G. Srinivasan and D.H. Reneker, *Polym. Int.* 36 (1995), p. 195.
- [22] D.H. Reneker and I. Chun, *Nanotechnology* 7 (1996), p. 216.
- [23] S.L. Shenoy, W.D. Bates, H.L. Frisch, and G.E. Wnek, *Polymer*, 46 (2005), p. 3372.
- [24] S.A. Theron, A.L. Yarin, and E. Zussman, *Polymer*, 46 (2005), p. 2889.
- [25] T.A. Bak and W.G. Kauman, *Trans. Faraday Soc.* 55 (1959), p. 1109.
- [26] D. Lukas, E. Kostakova, and A. Sarkar, *Computer simulation of moisture transport in fibrous materials*, in *Thermal and Moisture Transport in Fibrous Materials*, N. Pan and P. Gibson, eds., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2006, pp. 469–541.
- [27] A.W. Adamson and A.P. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [28] E.D. Shchukin, A.V. Pertsov, E.A. Amelina, and A.S. Zelenev, *Colloid and Surface Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [29] C. Kittel and H. Kroemer, *Thermal Physics*, Freeman and Company, New York, 2000.
- [30] G. Gouy, *Ann. Phys.* 9 (1910), p. 455.
- [31] D.L. Chapman, *Phil. Mag.* 25 (1913), p. 475.
- [32] P. Debye and E. Huckel, *Physikalische Zeitschrift* 4 (1923), p. 185.
- [33] R.P. Feynman, R.B. Leighton, and M. Sands, *Feynman Lectures on Physics*, Vol. II, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, MA, 1971.
- [34] F. Andrietti, A. Peres, and R. Pezzotta, *Biophys. J.* 16 (1976), p. 1121.
- [35] C.J. Smith, *A Degree Physics (Part V) – Electricity and Magnetism*, Radha Publishing House, London, 1992.
- [36] A. Doyle, D.R. Moffett, and B. Vonneguit, *J. Colloid Interface Sci.* 19 (1964), p. 136.
- [37] J.C. Berg and D.C. George, *Monthly Weather Rev.* 95 (1967), p. 884.
- [38] A.I. Grigor'ev, *Sov. Phys. Tech. Phys.* 30 (1985), p. 736.
- [39] J.H. Jeans, *The Mathematical Theory of Electricity and Magnetism*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1908.
- [40] M.C. Gray, *Q. Appl. Math.* 11 (1953), p. 311.
- [41] D. Lukas, A. Sarkar, and P. Pokorny, *J. Appl. Phys.* 103 (2008), p. 084309.
- [42] A. Sarkar, D. Lukas, and M. Weng, *Electrospinning as an Application of the Physical Law of Dielectric Diffusion*, Poly-2008 Conference, New Delhi, India, 2008.
- [43] M.M. Breuer and D. Robinson, *Nature* 221 (1969), p. 1116.
- [44] L. da Vinci, *The Notebooks of Leonardo da Vinci*, E. MacCurdy, ed. and transl., Reynal and Hitchcock, New York, 1938.
- [45] *The Encyclopedia Americana: A Library of Universal Knowledge*. New York: Encyclopedia Americana Corp., 1918.
- [46] J. Eggers and E. Villermaux, *Rep. Progr. Phys.* 71 (2008), p. 1.
- [47] L. Rayleigh, *Proc. Lond. Math. Soc.* s1–10 (1878), p. 4.
- [48] J. Plateau, *Statique Experimentale et Theoretique des Liquids Soumis aux Seriles Forces Molecularies*, Gauthier-Villars, Paris, 1873.
- [49] R.J. Roe, *J. Colloid Interface Sci.* 50 (1957), p. 70.
- [50] S. Tomotika, *Proc. R. Soc. Lond. A* 150 (1935), p. 322.
- [51] B.J. Meister and G.F. Scheele, *Am. Inst. Chem. Eng. J.* 13 (1967), p. 682.
- [52] P.G. de Gennes, F. Wyart-Brochard, and D. Quere, *Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves*, Springer-Verlag, New York, 2003.
- [53] S. Chandrasekhar, *Hydrodynamic and Hydromagnetic Instability*, Clarendon Press, Oxford, 1961.

- [54] X.H. Qin, Y.Q. Wan, J.H. He, J. Zhang, J.Y. Yu, and S.Y. Wang, *Polymer*, 45 (2004), p. 6409.
- [55] B.J. West, *Chaos, Soliton. Fract.* 20 (2004), p. 33.
- [56] J.T. Kuikka, *Int. J. Nonlinear Sci. Numer. Simul.* 4 (2003), p. 317.
- [57] Y.M. Shin, M.M. Hohman, M.P. Brenner, and G.C. Rutledge, *Polymer*, 42 (2001), p. 09955.
- [58] L. Wannatong, A. Sirivat, and P. Supaphol, *Polym. Int.* 53 (2004), p. 1851.
- [59] J.F. Cooley, *Apparatus for Electrically Dispersing Fluids*, U.S. Patent No. 692 631, 1902.
- [60] W.E. Teo and S. Ramakrishna, *Nanotechnology* 17 (2006), p. 89.
- [61] H. Liu and Y.L. Hsieh, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 40 (2002), p. 2119.
- [62] B. Sundaray, V. Subramaian, T.S. Natarajan, R.Z. Xiang, C.C. Chang, and W.S. Fann, *Appl. Phys. Lett.* 84 (2004), p. 1222.
- [63] I. Chun, *Fine Fibres Spun by Electrospinning Process from Polymer Solutions and Polymer Melts*, Ph.D. diss., University of Akron, OH, 1995.
- [64] L. Larrondo and R.S.J. Manley, *J. Polym. Sci.* 19 (1981), p. 909.
- [65] L. Larrondo and R.S.J. Manley, *J. Polym. Sci.* 19 (1981), p. 921.
- [66] L. Larrondo and R.S.J. Manley, *J. Polym. Sci.* 19 (1981), p. 933.
- [67] J. Lyons, *Melt-electrospinning of Thermoplastic Polymers: An Experimental and Theoretical Analysis*, Ph.D. diss., Drexel University, 2004.
- [68] J. Lyons, Ch. Li, and F. Ko, *Polymer*, 45 (2004), p. 7597.
- [69] M. Komarek and L. Martinova, *Melt-Electrospinning of Polypropylene Nanofibres*, Autex2006, Raleigh, NC, 2006.
- [70] N. Ogata, N. Shimada, S. Yamaguchi, K. Nakane, and T. Ogihara, *J. Appl. Polym. Sci.* 105 (2007), p. 1127.
- [71] H. Zhou, T.B. Green, and Y.L. Joo, *Polymer*, 47 (2006), p. 7497.
- [72] J. Tureckova, I. Prokopova, J. Nahlik, M. Komarek, V. Sasek, and C. Novotny, *Biodegradable Aromatic-aliphatic Co-polyesters Based on Poly(ethyleneterephthalate) from Disposed PET Bottles Suitable for Melt Electrospinning*, Junior Euromat, Suisse, 2008.
- [73] E. Zhmayev, H. Zhou, and Y.L. Joo, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* 153 (2008), p. 95.
- [74] H. Giesekus, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* 11 (1982), p. 69.
- [75] C.P. Carroll and Y.L. Joo, *Phys. Fluids*. 18 (2006), p. 053102.
- [76] *McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology*, 5th edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York 2007.
- [77] J.H. Mason, *Proc. Inst. Electr. Eng. C* 102 (1955), p. 254.
- [78] H. Zhou and J.L. Yoo, *Apparatus and Method for Elevated Temperature Electrospinning*, U.S. Patent No. 7326043, 2008.
- [79] T. Song, Y. Zhang, T. Zhou, Ch. Lim, S. Ramakrishna, and B. Liu, *Chem. Phys. Lett.* 415 (2005), p. 317.
- [80] A. Bazilevsky, A.L. Yarin, and C.M. Megaridis, *Langmuir*, 23 (2007), p. 23114.
- [81] Y. Dror, W. Salalha, R. Avrahami, E. Zussmann, A.L. Yarin, R. Dersch, A. Greiner, and J.H. Wendorf, *Small* 6 (2007), p. 1064.
- [82] T. Song, Y.Z. Zhang, and T.J. Zhou, *J. Magnetism Magn. Mater.* 303 (2006), p. 286.
- [83] G. Rutledge, J.H. Yu, and S.V. Fridrikh, *Production of Submicron Diameter Fibres by Two-fluid Electrospinning Process*, World Intellectual Property Organization, Patent No. WO09568, 2005.
- [84] L.D. Li, Y. Wand, and Y. Xia, *Nano Lett.* 4 (2004), p. 933.
- [85] S. Reznik, A.L. Yarin, E. Zussman, and L. Berkovici, *Phys. Fluids* 18 (2006), p. 062101.
- [86] H. Jiang, Y. Hu, Y. Li, P. Zhao, K. Zhu, and W. Chen, *J. Control. Release* 108 (2005), p. 237.
- [87] B.S. Gupta, M.W. King, S. Hudson, R. Hufenus, J. Gluck, and A. Moghe, *Electrospun Core-sheath Fibres for Soft Tissue Engineering*, NTC Project, Project No. F05-NS04, 2007.
- [88] Z. Sun, E. Zussman, A.L. Yarin, J.H. Wendorf, and A. Greiner, *Adv. Mater.* 15 (2003), p. 1921.
- [89] P.C. Hiemenz and T.P. Lodge, *Polymer Chemistry*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2007.
- [90] A.L. Andrad, *Science and Technology of Polymer Nanofibres*, Wiley, Hoboken, NJ, 2008.
- [91] A. Ganot, *Traite elementaire de physique experimentele et appliquee et de meteorology*, 415 ed. Paris: Imprimerie, J. Claye, 1855.
- [92] T.T. Brown, *A Method of and an Apparatus or Machine for Producing Force or Motion*, British Patent No. 300311, 1927.
- [93] F.X. Canning, C. Melcher, and E. Wient, *Asymmetrical Capacitors for Propulsion*, Nasa/CR-2004-213312, Morgan town, West Virginia, 2004.

- [94] J. Primas, *Electrical Properties of High-voltage Capacitors with Asymmetrical Electrodes*, Diploma thesis, Technical University of Liberec, 2008.
- [95] M. Malik, *Mechanical Properties of High-voltage Capacitors with Asymmetrical Electrodes*, Diploma thesis, Technical University of Liberec, 2008.
- [96] A.A. Akopjan, G.V. Butkevic, L.F. Dmochobskaja, E.S. Krucharkin, G.A. Lebedev, D.V. Razebig, A.S. Sergejev, and L.I. Sirotninskij, *Technika vysokich naprjazenij*, Gosenergoizdat, Moscow, 1951.
- [97] V. Lysenko, *VN zdroje*, BEN – technická literatura, Praha, 2008.
- [98] V. Petrzálka and S. Safrata, *Elektrina a magnetismus*, ÈSAV, Praha, 1956.
- [99] A.I. Grigor'ev and O.A. Sinkevich, *Soviet Phys. Tech. Phys.* 29 (1984), p. 735.
- [100] I.P. Stakhanov, *Physical Nature of Ball Lightning [in Russian]*, Atomizdat, Moscow, 1959.
- [101] B.A. Kozlov and V.I. Solovyov, *Tech. Phys.* 52 (2007), p. 892.
- [102] S. Ray, *J. Sci. Instrum.* 3 (1926), p. 126.
- [103] T. Chvojka, *Dependence Deflection Jet of Polymeric Solution on External Auxiliary Field at Electrostatic Electrospinning*, Diploma thesis, Technical University of Liberec, 2008.
- [104] A. Sarkar, *Physical principles of electrospinning*, Doctoral thesis, Department of Nonwovens, Textile Engineering, Technical University of Liberec, 2009.
- [105] H. Remy, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Akademische Verlagsgesellschaft Becker and Erler Kom. Ges, Leipzig, 1942.
- [106] I. Batkin, R.B. Del Re, J.G. Boutin, and J. Armitage, *Phys. Med. Biol.* 43 (1998), p. 487.
- [107] P.C. Hiemenz, *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, CRC Press, New York, 1997.
- [108] T. Jarusuwannapoom, W. Hongrojjanawiwat, S. Jitjaicham, L. Wannatong, M. Nithitanakul, C. Pattamaprom, P. Koombhongse, R. Rangkupan, and P. Supaphol, *Eur. Polym. J.* 41 (2000), p. 409.
- [109] P.J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1953.
- [110] J.H. Hildebrand and R.L. Scott, *The Solubility of Nonelectrolytes*, Dover Publications, New York, 1964.
- [111] Ch. Hansen, *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook*, CRC Press, New York, 2007.
- [112] J. Burke, *The Book and Paper Group Annual* 3 (1984), p. 13.
- [113] O. Jirsak and L.C. Wadsworth, *Nonwoven Textiles*, Carolina Academic Press, Durham, 1999.
- [114] M. Bognitzki, W. Czado, T. Frese, A. Schaper, M. Hellwig, M. Steinhart, A. Greiner, and J.H. Wendorff, *Adv. Mater.* 13 (2001), p. 70.
- [115] M.S. Khil, S.R. Bhattarai, H.Y. Kim, S.Z. Kim, and K.H. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.* 72B (2004), p. 117.
- [116] S.O. Han, W.K. Son, J.H. Youk, T.S. Lee, and W.H. Park, *Mater. Lett.* 59 (2005), p. 2998.
- [117] H. Morawetz, *Macromolecules in Solution*, Wiley, New York, 1975.
- [118] B.L. Hager and G.C. Berry, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 20 (2003), p. 911.
- [119] C. Tanford, *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York, 1961.
- [120] P. Rai and S.L. Rosen, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 35 (1997), p. 1985.
- [121] M. P'radn'y, L. Martinova, J. Michalek, T. Fenclova, and E. Krumbholcova, *Cent. Eur. J. Chem.* 5 (2007), p. 779.

Příloha č. 11

Pokorny, P., Kostakova, E., Sanetrnik, F., Mikes, P., Chvojka, J., Kalous, T., Bilek, M., Lukas, D.: Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production, PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS Volume: 16 Issue: 48 Pages: 26816-26822 Published: 2014 (IF 4,123)



Cite this: DOI: 10.1039/c4cp04346d

Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production†

P. Pokorný,^a E. Kostakova,^a F. Sanetrik,^{ab} P. Mikes,^{ab} J. Chvojka,^{ab} T. Kalous,^a M. Bilek,^{bc} K. Pejchar,^{bc} J. Valtera^{bc} and D. Lukas^{*ab}

Nanofibrous materials are essential components for a wide range of applications, particularly in the fields of medicine and material engineering. These include protective materials, sensors, cosmetics, hygiene, filtration and energy storage. The most widely used and researched technology in these fields is electrospinning. This method for producing fibers yields highly promising results thanks to its versatility and simplicity. Electrospinning is employed in multiple forms, among which needle and needleless direct current (DC) variants are the most distinctive. The former is based on the generation of just one single jet from a nozzle; hence this fabrication process is not very productive. The latter uses the destabilization of free liquid surfaces by means of an electric field, which enhances the throughput since it produces numerous jets, emitted from the surfaces of rollers, spheres, strings and spirals. However, although some progress in total producibility has been achieved, the efficiency of the DC method still remains relatively low. A further drawback of DC electrospinning is that both variants need a collector, which makes it difficult to combine DC electrospinning easily with other technologies due to the presence of the high field strength within the entire spinning zone. This paper describes our experiments with AC electrospinning. We show that alternating current (AC) electrospinning based on a needleless spinning-electrode provides a highly productive smoke-like aerogel composed of nanofibers. This aerogel rises rapidly from the electrode like a thin plume of smoke, without any need for a collector. Our work shows that AC needleless electrospinning gains its efficiency and collector-less feature thanks to the creation of a perpetually charge-changing virtual counter-electrode composed of the nanofibers emitted. High-speed camera recordings demonstrate the formation mechanism of the nanofibrous plume, which is wafted by an electric wind. This wind's velocity field is experimentally investigated. One potential use of AC needleless electrospinning is demonstrated here by spinning it into a yarn.

Received 26th September 2014,
Accepted 17th October 2014

DOI: 10.1039/c4cp04346d

www.rsc.org/pccp

Introduction

Electrospinning, one of the methods currently available for the production of fibrous nanostructures, is a unique technology not only because of its operational simplicity, but since it can also be effectively scaled up to the industrial level. Electrospinning usually has two variants: needle and needleless. The needle variant, which

has a limited production rate in terms of unit grams per hour, prevailed in the eighties and nineties. Recently, more productive needleless electrospinning technologies have been developed based on the creation of numerous self-organized jets emerging from free liquid surfaces.^{1,2} Our experiments have shown that further enhancement of this technology can be achieved using a combination of AC high voltage and a needleless spinning-electrode.

Over the past decade, little research has been carried out into AC electrospinning, in contrast to the numerous detailed studies of its DC variant. The few studies available on AC electrospinning have focused on needle electrospinning processes driven by voltages ranging from 5 kV up to 10 kV.^{3–5} Our AC electrospinning apparatus consists of a 100 mm long metallic rod, 10 mm in diameter, employed as a spinning-electrode. The top of the rod is supplied with a polymeric solution using an infusion syringe pump. For the experiments, a 50 Hz line AC voltage was applied to the rod using a variable transformer with a maximal root mean square output of 30 kV. The apparatus works without an

^a Faculty of Textile Engineering, Technical University of Liberec, Studentska 2, Liberec 1, 461 17, Czech Republic. E-mail: david.lukas@tul.cz

^b Centre for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation of Technical university of Liberec, Studentska 2, Liberec 1, 461 17, Czech Republic

^c Faculty of Mechanical Engineering, Technical University of Liberec, Studentska 2, Liberec 1, 461 17, Czech Republic

† Electronic supplementary information (ESI) available: Supplementary information 1: a 'nanofibrous plume' emanating from the virtual collector, supplementary information 2: the nanofibrous plume, comprising recombined strands of nanofibers, moves away from the rod spinning-electrode, supplementary information 3: successive and repeated jet creations during AC electrospinning, supplementary information 4: a promising application of the nanofibrous plume in the production of nanofibrous yarns. See DOI: 10.1039/c4cp04346d

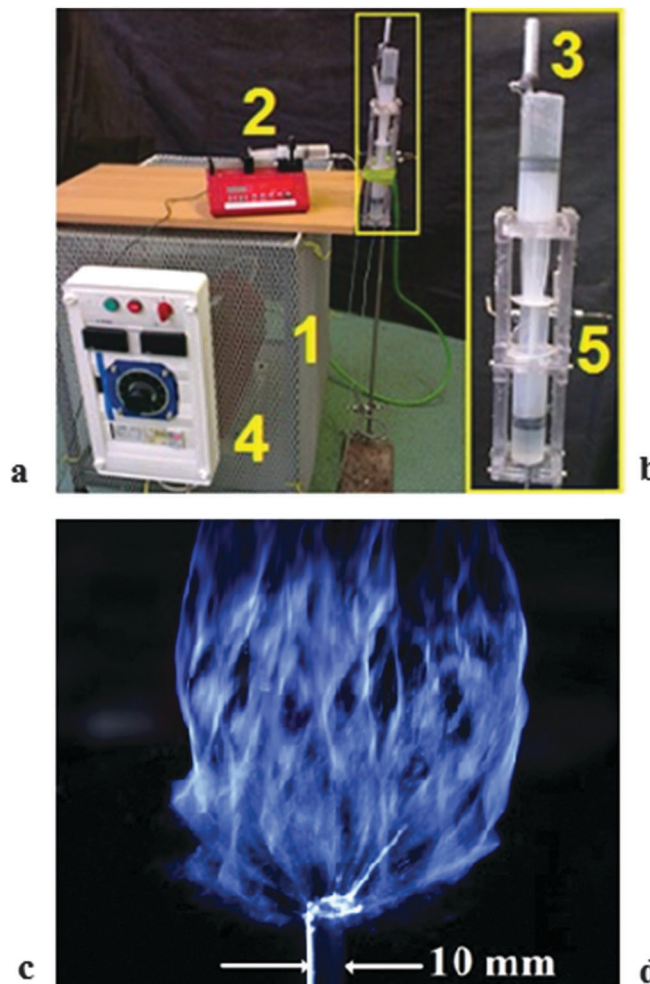
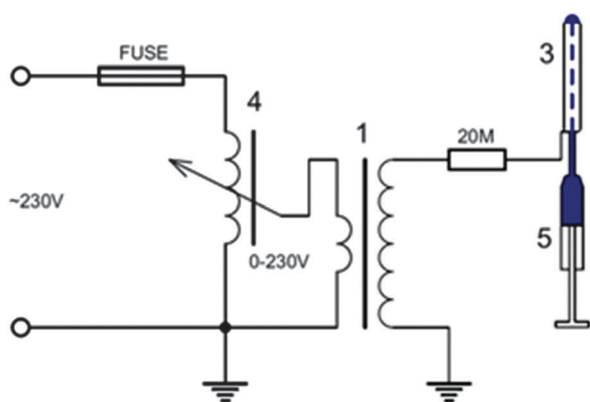


Fig. 1 The apparatus for AC electrospinning. (a and b) A schematic diagram and photograph of the AC electrospinning set-up, consisting of a metal rod (3) used as the spinning-electrode. The electrode is supplied with a polymeric solution. This is done using a syringe, which is powered by a hydraulic transmission device (5) controlled by an infusion pump (2). The high voltage supply is provided by means of a transformer (1) and a variable transformer (4). The apparatus works without an electrically active collector. (c) The fibers are formed inside a spinning zone that spans no more than 40 mm from the spinning-electrode. The spinning zone is formed between the top of the spinning-electrode and the virtual counter-electrode (6) composed of the nanofibers, which have been emitted. (d) The nanofibrous plume composed of PVB nanofibers generated by a rod-shaped spinning-electrode.

electrically active collector (Fig. 1a and b). Poly(vinyl butyral) (PVB) and polyacrylonitrile (PAN) were chosen as prototypical polymers, since they can be used for electrospinning at moderate potentials.

Experimental

Our AC electrospinning set-up showed fiber formation occurring at a critical voltage of 15.8 ± 7 kV and an optimum operating voltage of 30 kV for both PVB and PAN solutions. After switching the field on, the initiation of the formation of numerous jets could be seen (Fig. 1c). The solvent evaporating from the jets produced strands of solid nanofibers. These nanofibers formed a plastic aerogel that bears a strong resemblance to a plume of wispy smoke, which rises up from the spinning-electrode (Fig. 1d), (ESI,† supplementary information 1). Inside the plume, the nanofibers become entangled with each other.

The nanofibrous plume can therefore be easily taken hold of and gently manipulated using an appropriate tool. Moreover, this rising column of nanofibers is “compact”, in the sense that no nanofiber segment is able to escape from it. The column can be wound up into continuous ligaments, piled up on a flat surface or twisted into a yarn. At the same time, it is extremely sticky and cannot move along any surface it makes contact with. A similar aerogel consisting of carbon nanotubes was produced by Windle *et al.*⁶ and was called ‘elastic smoke’. After much consideration, we decided upon the term “nanofibrous plume”, since this expression best conveys the peculiar mechanical properties of the nanofibrous aerogel produced by our AC electrospinning method. This, then, is the term we have used throughout the paper.

The high-speed camera recordings showed that the number of jets per area was of the order of 1 mm^{-2} . This is one order of magnitude higher than conventional electrospinning processes. Maximum throughputs of AC and DC methods for

equivalent spinning-electrodes, polymeric solutions and voltage differences are compared in Table 1.

Table 1 Electrospinning throughputs. The maximum throughputs of AC and DC electrospinning variants are compared for PVB and a voltage of 30 kV

Type of spinning-electrode	AC electrospinning throughput in ml h ⁻¹	DC electrospinning throughput in ml h ⁻¹
Needle Ø 0.7 mm	80	1–3
Needleless Ø 10 mm	180	30

Methods

The AC needleless electrospinning set-up consisted of four components: an ABB KGUG 36 high-voltage transformer with a conversion ratio of 36 000/230 V, a residual-current device, a New Era NE-1000X dosing pump, and a rod electrode. The output voltage was controlled by a Thalheimer-Trafowerke ESS 104 variable transformer, designed for 230 V AC input and an output of 0–250 V. The maximum output current was 4 A with a capacity (KVA) of 1.2. A hydraulic transmission device (Technical University of Liberec) was used to isolate the pump from the AC high voltage supply. The transmission was achieved using two syringes, fixed in a polycarbonate holder, facing in opposite directions, with their plungers touching. The first syringe, containing water, was connected by a tube to a linear pump. The second syringe supplied the spinning-electrode with a polymer solution. The two plungers, which touch one another, transmitted the pressure inside the syringes and electrically insulated the water circuit from the polymer solution. Aluminum rod spinning-electrodes with outer diameters of 6, 8 and 10 mm, and of various lengths, spanning from 18 mm up to 150 mm, were used. The polymer solution was fed to the tip of the spinning-electrode *via* a 3 mm wide coaxial channel. The PVB, Mowital® B 60 H, was obtained from Kuraray America, Inc., and had an average molecular weight of 60 000 amu. A 10 wt% solution was prepared in ethanol–water (9:1 v/v). The polyacrylonitrile (PAN) was supplied by Sigma-Aldrich and had an average molecular weight of 150 000 amu. A 15 wt% solution of PAN was prepared in dimethylformamide from Penta, Czech Republic. The movement of nanofibers was detected using a high-speed camera system i-SPEED 3 with an F-mount lens connection and a recording frequency of 2000 Hz to obtain a maximum picture resolution of 1280 × 1024 px. The light source used was an ILP-1 with a discharge lamp of 120 W at a temperature of 5600 K and was focused using an optical cable. The analysis of the video obtained was carried out using the I-SPEED Suite software. A hot wire anemometer TESTO 425 with a resolution of 0.01 m s⁻¹ and a range 0–20 m s⁻¹ was used to measure ionic wind velocity. All the experiments were performed at a room temperature of 21 ± 2 °C and a humidity rate of 52 ± 5%.

Results and discussion

What follows is a phenomenological description of the fiber formation mechanisms under the AC potential, based on the

analysis of high-speed camera videos. The most obvious difference between DC and AC needleless variants of electrospinning is that the latter needs no counter-electrode/collector. Even when a grounded collector was provided, the AC spinning process was not affected by this. Therefore we hypothesize that the AC process possesses some kind of self-organized counter-electrode, which enables the appearance of super-critical field strength values on the polymer solution surface. This strength was estimated to be greater than 2.5 MV m⁻¹.¹ We also hypothesize that the self-organized counter-electrode is formed repeatedly in the immediate vicinity of the spinning-electrode. This counter-electrode consists of electrically charged nanofiber segments. The groups of nanofibers created by the spinning-electrode rapidly alternate (every 10 ms) between being either positively or negatively charged. Their electric charge corresponds to the respective positive or negative charge of the currently ongoing voltaic half-wave, generated by the AC power-supply.

The newly-spun nanofibers partially recombine with those that have already formed the virtual counter-electrode. This process is continuously repeated due to the AC nature of the high voltage applied (Fig. 1c), (ESI,† supplementary information 2). Alternately-charged nanofibrous groups from successive emissions attract each other to form what is described here as a ‘nanofibrous plume’ emanating from the virtual collector (Fig. 1d). The nanofibrous plume, comprising recombined strands of nanofibers, rose from the rod-shaped spinning-electrode along the direction of its axis. It moved at 0.25–0.6 m s⁻¹ due to an electric wind created by the spinning-electrode.⁷ When the nanofibrous plume was at a distance of 2–5 cm from the spinning-electrode, it was internally immobile without any fiber regrouping (ESI,† supplementary information 2). Our hypothesis that the virtual collector causes a charge recombination of the nanofibrous groups was supported by our aforementioned observations.

The movement of the nanofibrous plume caused by the electric wind is an important part of the AC collectorless electrospinning technique. The wind does not allow the newly-created nanofibers to be attracted back to the spinning-electrode during the next AC half-wave, when the spinning-electrode polarity is changed. Instead, they are attracted to one another to form groups inside the plume as a result of the Coulomb force, and are then blown away.

Electric, ionic or corona winds are gas flows driven by ions generated by corona discharges and accelerated in an applied electric field.^{8,9} Field-accelerated ions transfer momentum to surrounding gas. The electric wind is caused by both DC and AC fields and its velocity depends on actuator geometry, field strength and, in the case of the latter, also on AC frequency. Drews *et al.*⁸ observed that during high frequency AC regimes, the electric force causing the wind is localized near the point electrode. Therefore AC coronas can sustain wind velocity independently of electrode separation. Our set-up resembled the so-called “point-plate” actuator¹⁰ with a counter-electrode, *i.e.*, a collector, infinitely distant.

Fig. 2a shows the field of vertical components of electric wind velocity created by the spinning-electrode. In this experiment the spinning-electrode had a diameter of 10 mm and a

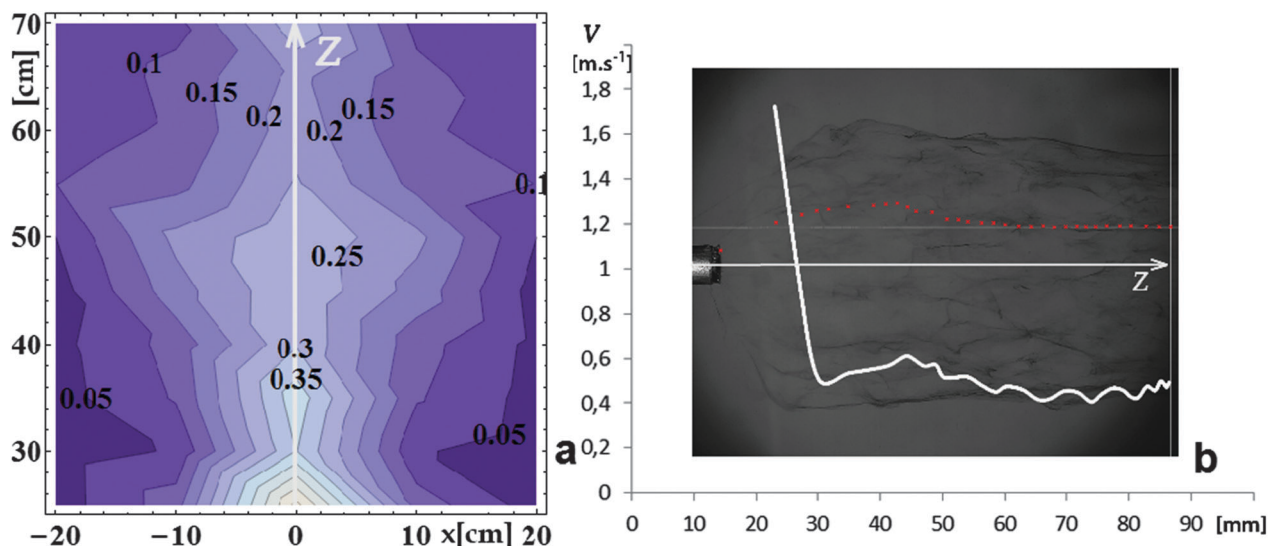


Fig. 2 Electric wind measurements. (a) Contour plot of vertical components of the electric wind velocity in m s^{-1} created by the spinning-electrode with a diameter of 10 mm whose axis coincides with the z coordinate. This is connected to a 50 Hz AC frequency power supply of a root mean square voltage of 30 kV. The tip of the spinning-electrode is positioned at $z = 0$. (b) The typical track of a polymeric droplet inside the nanofibrous plume, recorded using a high-speed camera. A plot of the velocity magnitude values v is included as a function of the z -axis distance from the spinning-electrode, which exhibits an abrupt change in the velocity derivative close to the distance $z = 30$ mm.

length of 150 mm, and was connected to a 50 Hz AC frequency power supply of the root mean square voltage of 30 kV. Velocity values were measured using the hot wire anemometer at an array of points, spanning 400×450 mm. This array was situated 250 mm above the spinning-electrode and lay in a plane containing the spinning-electrode axis. The top velocity at the point nearest to the spinning-electrode was $0.57 \pm 0.14 \text{ m s}^{-1}$. A minimum distance of 250 mm of the measurement area from the spinning-electrode ensured that the hot wire anemometer was protected from a possible electric discharge. The velocities of the electric wind measured at the same point array, without the electric field switched on, were negligible. Their values were $0.01 \pm 0.01 \text{ m s}^{-1}$.

The effect of the electric wind combined with a movement of the nanofibrous plume was also investigated. This was done by tracking polymeric droplets inside the nanofibrous plume as shown in Fig. 2b. The software I-SPEED provides us with velocity magnitude values that are plotted in the same figure. Velocity magnitude values have a significant change in their derivative at a distance of 29 ± 8 mm above the tip of the spinning-electrode, as was measured using 10 tracking trials. Therefore, we assume that the virtual collector was formed at this distance and electric charges of nanofibrous groups were recombined here. The velocity magnitude before the virtual collector steeply decays, while behind it, is nearly constant,

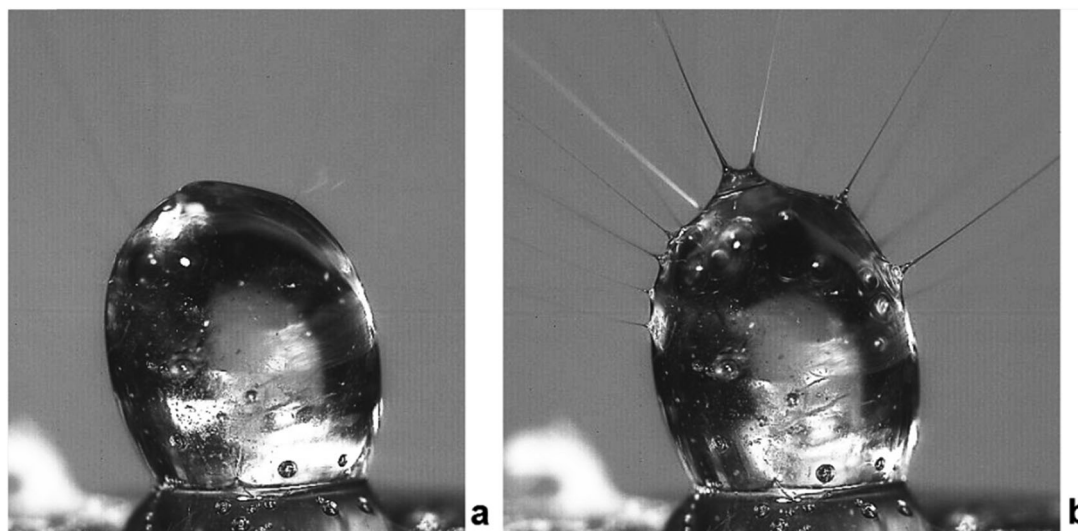


Fig. 3 Jet formation in AC Electrospinning. In repeated AC initiation, the time delay from the moment when (a) the jets have dispersed until (b) the new jets have formed is only 0.0006 s.

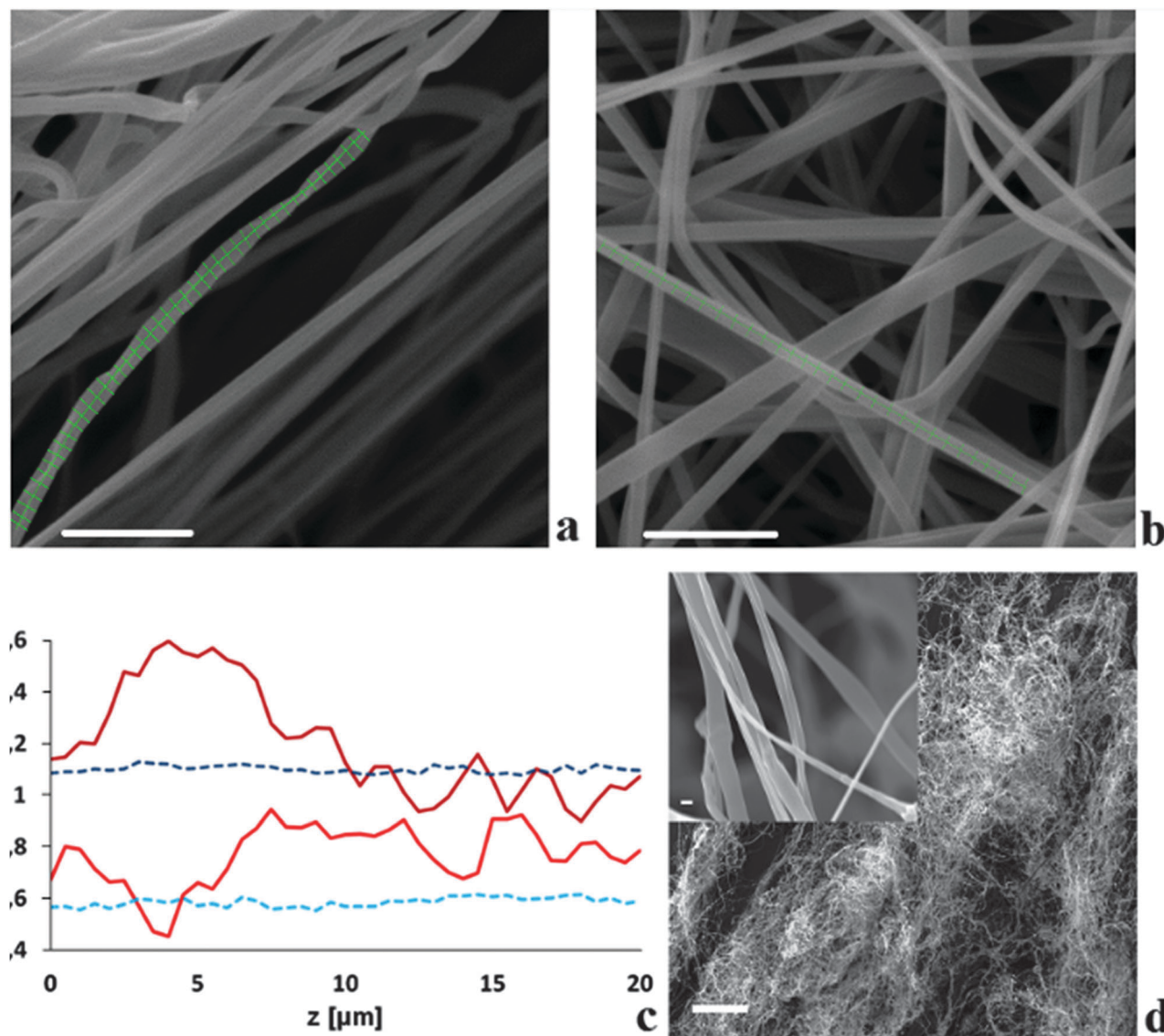


Fig. 4 SEM images of AC electrospun materials. (a) A SEM image of the PVB nanofibrous material produced by AC needleless electrospinning (scale bar 5 μm). (b) PVB fibers electrospun, using a DC method with the same rod-shaped spinning-electrode, from the same solution and at the same voltage as the former AC material (scale bar 5 μm). (c) Varicosity of two randomly-selected AC (continuous curves) and two DC (dashed curves) fibers evaluated as diameter measurements along fiber axes. (d) A SEM image of AC electrospun PVB fibers as an example of the nanofibrous material produced from organic solvents using the technology described. (scale bar 500 μm and 1 μm for the inset image).

$0.46 \pm 0.08 \text{ m s}^{-1}$. This value coincides with electric wind velocities measured using the anemometer.

The initiation of AC electrospinning is similar to that of DC electrospinning in the duration and formation of Taylor cones. High speed imaging revealed that the DC as well as the first AC initiations took about 0.0358–0.2486 s, depending on the polymeric solution composition and the voltage applied. However, our research revealed two differences. Firstly, the time for successive and repeated jet creation during AC electrospinning was extremely short. The jets disappeared at the end of each voltaic half-wave and were newly created when the voltage increased. Recordings from the high-speed camera showed that it took only 0.0006 s for the jets to form again (ESI,[†] supplementary information 3). In addition, the large conical protuberances (Taylor cones) did not appear

in the case of AC electrospinning. Instead, the jets emanated directly from a seemingly relaxed polymeric droplet attached to the spinning-electrode (Fig. 3a).

Fig. 4a shows the microscopic image of a PVB nanofibrous material produced under AC conditions with a potential of 20 kV. Fibers in this material are highly tortuous (inter-twined) due to the mechanism of their creation, in which positively and negatively charged jet segments are mutually attracted. The AC electrospun PAN material exhibits similar morphological features (Fig. 4d). The most striking feature of AC nanofibers is their varicose appearance. Varicosity is expressed here as a plot of fiber diameter measured along a fiber length. The varicosity of AC and DC electrospun PVB nanofibers is compared, in order to show the differences (Fig. 4c). These AC and

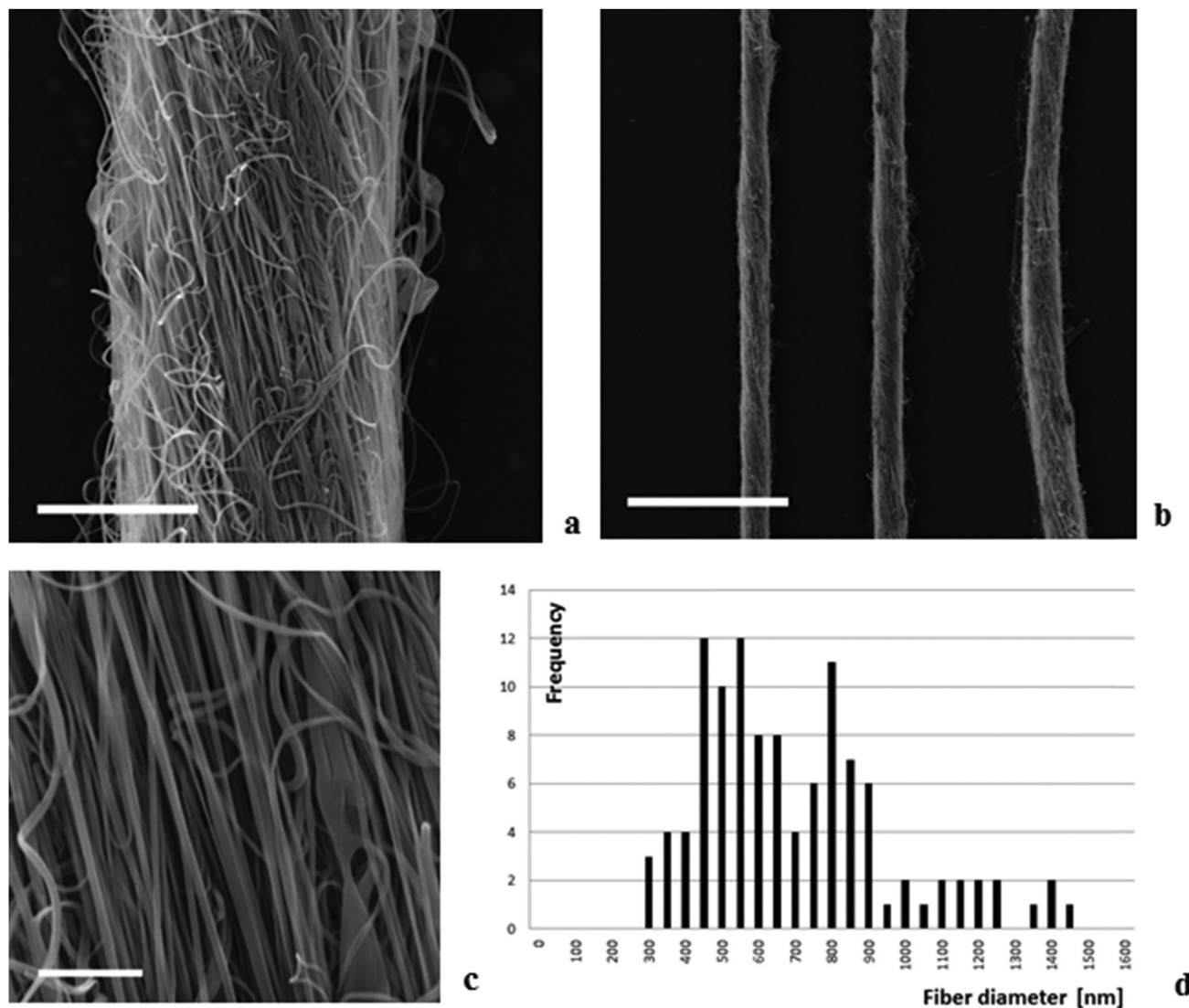


Fig. 5 SEM images of PVB yarns spun from the nanofibrous plume and a fiber diameter histogram. (a) Nanofibrous yarn was directly produced from the nanofibrous plume and formed using the circular brush attached to the Proxxon Rotary Tool (scale bar 50 μm). (b) Three yarn pieces taken from the ends and the middle part of a 5 m long yarn, which show good reproducibility of its diameter (scale bar 500 μm). (c) The detailed picture of the same material (scale bar 10 μm). (d) Histogram of the fiber diameter in the PVB needleless AC electrospun yarn.

DC nanofibrous samples were prepared from the same PVB solution and a similar voltage was applied in their production.

Our investigations into AC electrospinning have revealed that the nanofibrous plume has mechanical properties which make it eminently suitable for twisting to form a yarn. This plume is enormously ductile and hence its ends can be attached to a circular brush which, in turn, is attached to an FBS 115/E Proxxon Rotary Tool. This tool is capable of producing a rotation speed between 5000 and 20 000 rpm. The number of twists per unit length allows the formation of nanofibrous yarns of a predetermined density (ESI,† supplementary information 4). A similar short-yarn spinning technology has been developed for short electrospun nanofibrous yarns gathered from a special multi-plate rotating collector.¹¹ SEM images of PVB yarns electrospun from the nanofibrous plume are introduced in Fig. 5a–c. In addition, the average fiber diameter of the

AC-spun PVB nanofibers spun onto the yarn is far less than 1 μm (Fig. 5d).

Conclusions

In summary, our experiments have shown that AC electrospinning combined with an appropriately shaped, needleless spinning-electrode is highly efficient at generating a dense plume of nanofibers. The efficiency of this method is achieved by means of the virtual counter-electrode. This virtual counter-electrode formed by a cloud of nanofibers is recreated periodically in each half-wave of the AC cycle. The recombined pieces of newly-formed nanofibers are then moved by the electric wind to create the nanofibrous plume. The AC needleless electrospinning method introduced in this work has the potential to be linked

to existing technologies. There are two significant reasons for this. Firstly, there is no obstacle, such as a collector, along the spinning line. AC electrospinning can therefore be used for the mass production of nanofibers thanks to its remarkable throughput. In addition, the immediate product of AC electrospinning is a compact aerogel (*i.e.* the plume of nanofibers), which can be readily manipulated for further processing. As an example of this, we have introduced a promising application of the nanofibrous plume, namely the production of nanofibrous yarns.

With the rapid developments in nano-science and nano-technology, yarns composed of nanofibers may open up a whole range of new possibilities. One such application is the production of a porous artificial proboscis, which could be used to collect tiny liquid samples.¹¹ Nanofibrous yarns are also the basic material element for the development of nanofibrous structures, such as woven and knitted fabrics, macrame and laces,¹² whose mechanical, sorption and filtration properties will significantly differ from that of conventional textiles. Nanofibrous textiles may also have great potential uses in the field of medicine. They are able to meet the criteria for medical applications¹³ largely as a result of the unique characteristics mentioned here in this paper.

Acknowledgements

We thank Lubomir Kocis, EGU HV Laboratory a.s., for his assistance in the initial experiments and for the fruitful discussions we had with him. The authors acknowledge the support of GACR, Grant no. P208/12/0105.

Notes and references

- 1 D. Lukas and A. Sarkar, *J. Appl. Phys.*, 2008, **103**, 0843091, DOI: 10.1063/1.2907967.
- 2 T. Miloh, B. Spivak and A. L. Yarin, *J. Appl. Phys.*, 2009, **106**, 114910, DOI: 10.1063/1.3264884.
- 3 R. Kessick, J. Fenn and G. Tepper, *Polymer*, 2004, **45**, 2981, DOI: 10.1016/j.polymer.2004.02.056.
- 4 S. Sarkar, S. Deevi and G. Tepper, *Macromol. Rapid Commun.*, 2007, **28**, 1034, DOI: 10.1002/marc.200700053.
- 5 S. Maheshwari and H. C. Chang, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 349, DOI: 10.1002/adma.200800722.
- 6 Y.-L. Li, I. A. Kinloch and A. Windle, *Science*, 2004, **304**, 276, DOI: 10.1126/science.1094982.
- 7 A. M. Drews, L. Cademartiri, G. M. Whitesides and K. J. M. Bishop, *J. Appl. Phys.*, 2014, **114**, 143302, DOI: 10.1063/1.4824748.
- 8 A. M. Drews, L. Cademartiri, G. M. Whitesides and K. J. M. Bishop, *J. Appl. Phys.*, 2013, **114**, 143302, DOI: 10.1063/1.4824748.
- 9 B. A. Kozlov and V. I. Solovyov, *Tech. Phys.*, 2007, **52**, 892–897, DOI: 10.1134/S1063784207070109.
- 10 L. B. Loeb, *Electrical Coronas*, University of California Press, Berkeley, 1965.
- 11 Ch.-Ch. Tsai, P. Mikes, T. Andruk, E. White, D. Monaenkova, O. Burtovyy, R. Burtovyy, B. Rubin, D. Lukas, I. Luzinov, J. R. Owens and K. G. Kornev, *Nanoscale*, 2011, **3**, 4685–4695.
- 12 U. Ali, Y. Zhou and T. Lin, *Electrospinning of continuous nanofiber bundles and twisted nanofiber yarn*, *Nanofibers – Production, Properties and Functional Applications*, 2011, DOI: 10.5772/25059.
- 13 V. Bartels, *Handbook of medical textiles*, Woodhead Publishing Series in Textiles, Elsevier, 2011, ISBN 085709369X.

Příloha č. 12

Kožní kryt **Nanotardis** a jeho funkce použití rozhodnutí a návod k použití



STÁTNÍ ÚSTAV
PRO KONTROLU LÉČIV

Šrobárova 48
100 41 Praha 10

Telefon: +420 272 185 111
Fax: +420 271 732 377

E-mail: posta@sukl.cz
Web: www.sukl.cz

ADRESÁT
Technická univerzita v Liberci
IČ: 46747885
prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs
rektor

ZASTOUPEN
k rukám
prof. RNDr. Davida Lukáše, CSc.

ADRESA PRO DORUČENÍ
Studentská 1402/2
Liberec 1
461 17

Spisová zn. sukl176924/2016
Č. jedn. sukl40517/2017

Vyřizuje/linka
Dubská/780

Datum
21. 2. 2017

ROZHODNUTÍ

Státní ústav pro kontrolu léčiv, se sídlem v Praze 10, Šrobárova 48 (dále jen „Ústav“), jako orgán příslušný k rozhodnutí podle § 9 písm. h) a § 15 zákona č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích a o změně zákona č. 634/2004 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon o zdravotnických prostředcích“), rozhodl v souladu s tímto zákonem a s § 67 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „správní řád“),

takto:

Účastníkovi správního řízení, sp. zn. sukl176924/2016, zahájeného dne 28. 6. 2016 na základě žádosti o povolení provedení klinické zkoušky **Hodnocení zdravotnického prostředku NANOTARDIS k léčbě čistých akutních a chronických kožních defektů**, společnosti **Technická univerzita v Liberci**, se sídlem **Studentská 1402/2, 461 17 Liberec 1, IČ: 46747885**, Ústav tímto v souladu s § 9 písm. h) a § 15 zákona o zdravotnických prostředcích **povoluje** provedení klinické zkoušky:

Název klinické zkoušky	Hodnocení zdravotnického prostředku NANOTARDIS k léčbě čistých akutních a chronických kožních defektů
Název zdravotnického prostředku	NANOTARDIS
Číslo protokolu	1/2016

Odůvodnění

V souladu § 68 odst. 4 správního řádu není odůvodnění třeba, jestliže správní orgán prvního stupně všem účastníkům v plném rozsahu vyhoví.

Poučení

Proti tomuto rozhodnutí je možno podat podle § 81 správního řádu u Ústavu odvolání, a to ve lhůtě do 15 dnů ode dne jeho doručení. O odvolání rozhoduje Ministerstvo zdravotnictví ČR. V souladu s § 81 odst. 2 správního řádu se lze vzdát práva na odvolání, a to písemně nebo ústně do protokolu. Rozhodnutí v takovém případě nabývá právní moci v souladu s § 73 odst. 1 správního řádu dnem vzdání se práva na odvolání.

Otisk úředního razítka

MVDr. Irena Víchová
vedoucí oddělení klinického hodnocení
zdravotnických prostředků



Návod k použití zdravotnického prostředku NANOTARDIS pro klinickou zkoušku

Zdravotnický prostředek NANOTARDIS je určen k použití jako zdravotnický prostředek v klinické zkoušce. Za tímto účelem je dodáván v podobě vrstvené nanovláknenné a mikrovláknenné netkané textilie. Vrstva podkladového materiálu je tvořená netkanou textilií spunbond z polypropyleny (PP), který je modře barven ve hmotě. Podkladová vrstva usnadňuje manipulaci se zdravotnickým prostředkem před aplikací. Vlastní funkční vrstva zdravotnického prostředku NANOTARDIS je nanovláknenná vrstva vyrobená z PCL. Funkční vrstva má podobu tenké membrány bílé barvy. Obě vrstvy, funkční i podkladová, jsou vzájemně spojené pouze fyzikálními (Van der Waalsovými) silami a lze je snadno od sebe oddělit. Strany funkční bílé netkané nanovláknenné vrstvy jsou identické, proto je možné přiložit tuto vrstvu na poranění z obou stran, tedy z rubové i lící strany. Jelikož je zdravotnický prostředek NANOTARDIS biodegradabilní, nemusí být původní kryt strháván, čímž by se narušil proces hojení. Po vstřebání kožního krytu lze znovu aplikovat novou vrstvu zdravotnického prostředku NANOTARDIS. Četnost aplikací zdravotnického prostředku NANOTARDIS se volí individuálně dle vzhledu rány.

Zdravotnický prostředek NANOTARDIS má tyto vlastnosti:

- snadná aplikace zdravotnického prostředku,
- dobrá snášenlivost pacienty,
- dobrá splývavost materiálu,
- prostředek je dodáván ve sterilním balení a není možná jeho další resterilizace,
- balení zdravotnického prostředku NANOTARDIS je po jednotlivých kusech,
- zdravotnický prostředek NANOTARDIS lze vyrobit v libovolných rozměrech, pro klinické zkoušky bude dován o rozměrech 7 x 7 cm²,
- expirační doba prostředku po sterilizaci je 12 týdnů.

NANOTARDIS je složen z komerčně dostupného polymeru polykaprolaktonu (PCL). Polykaprolakton je biologicky odbouratelný polyester s nízkou teplotou tání 58 °C a teplotou skelného přechodu přibližně -72 °C. PCL degraduje hydrolýzou esterových vazeb za fyziologických podmínek.

PCL byl schválen americkou Food and Drug Administration (FDA) pro specifické aplikace v lidském těle, například pro výrobu prostředků pro podání léčiv a chirurgické nitě (obchodní název Monocryl). Je tedy vhodný jako biomateriál, který je využíván pro výrobu dlouhodobých implantabilních prostředků. V současné době je intenzivně testován jako materiál pro tzv. scaffoldy pro reparaci tkání prostřednictvím tkáňového inženýrství.

Popis mechanismu účinku zkoušeného zdravotnického prostředku společně s podpůrnou vědeckou literaturou

Proces hojení akutních i chronických ran je komplexní děj. V současné době používané „vlhké hojení ran“ má své limity stejně tak jako dočasné krytí ran. Nanovláknenná PCL struktura vyrobená elektrospinningem je velice podobná svou morfologií mezibuněčné hmotě kůže, a proto je ideální k



využití jako základny pro reparaci a regeneraci této tkáně. Další výhodou je, že nanovlákná jsou extrémně tenká a snadno přilnou ke spodině rány. Díky použití biodegradabilního materiálu dochází postupně k vstřebávání materiálu a není nutné jeho odstraňování v průběhu léčby, což u jiných zdravotnických prostředků určených k hojení ran narušuje již započatý proces hojení. Nanovláknenné vrstvy mají vysokou pórovitost a svou přístupností pro vzdušný kyslík usnadňují a urychlují hojení ran. Velkým pozitivem je také to, že malé mezivláknenné póry působí jako antibakteriální bariéra.



a



b



c

Obr. 1: (a) Zdravotnický prostředek NANOTARDIS ve sterilním obalu-lící strana obalu. (b) Zdravotnický prostředek NANOTARDIS ve sterilním obalu - rubová strana obalu. (c) Makroskopický pohled na nanovláknennou vrstvu NANOTARDIS oddělenou od nanovláknenné netkané textilie typu spunbond.



Pokyny výrobce pro použití zkoušeného zdravotnického prostředku včetně všech nezbytných požadavků na skladování a manipulaci, přípravu k použití, všech kontrol bezpečnosti nebo funkčnosti a všech opatření, která je potřeba provést po použití (např. likvidace)

Pro klinické zkoušky je zdravotnický prostředek NANOTARDIS dodáván o rozměrech 7 x 7 cm², viz Obr. 1. Po vyjmutí NANOTARDIS ze sterilního obalu lékař zvolí velikost aplikovaného dílu podle rozměrů kožního poranění. Za sterilních podmínek pomocí nůžek pak upraví tvar dílu NANOTARDIS tak, aby odpovídal rozměrům rány. Rozměry odstřiženého dílu musí být takové, aby NANOTARDIS pokryl pouze ránu a nepřecházel do oblastí zdravé okolní kůže. V případě rozsáhlejšího kožního poranění se díly NANOTARDIS skládají na ránu těsně k sobě. Součástí sterilního balení je i modrá podkladová netkaná textilie spunbond. Tu je nutno před aplikací odstřižených dílů zdravotnického prostředku NANOTARDIS za sterilních podmínek odstranit. Na defekt jemně a za sterilních podmínek přikládáte pouze bílou nanovláknennou vrstvu z PCL tak, aby mezi dílem NANOTARDIS a kožním poraněním nevznikaly prostory vyplněné vzduchem.

Četnost aplikací zdravotnického prostředku NANOTARDIS lze volit dle posouzení ošetřujícího lékaře v závislosti na aktuálním stavu rány a nutnosti jejího ošetřování. Jelikož je zdravotnický prostředek NANOTARDIS biodegradabilní, neměl by být původní kryt strháván, čímž by se narušil proces hojení. Po vstřebání kožního krytu lze znovu aplikovat novou vrstvu zdravotnické prostředku NANOTARDIS. Nanovláknennou textilií lze kombinovat s vybranými produkty určenými k hojení kožních ran.

Identifikace rizik spojených s použitím zdravotnického prostředku NANOTARDIS, jejich úrovní a pravděpodobnosti je uvedena v Příručce zkoušejícího v kapitole 3.5 Řízení rizika.

Popis zdravotnického prostředku NANOTARDIS je doplněn fotodokumentací uvádějící makroskopické i mikroskopické pohledy na nanovláknennou vrstvu z PCL.

Vzor etikety včetně symbolů o vlastnostech zdravotnického prostředku NANOTARDIS

